

**Über die scharf schmeckenden Stoffe
des Wolligen Milchlings,
Lactarius vellereus FRIES**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Herwig Hackenberg
aus Unter Sandau bei Marienbad

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

**Über die scharf schmeckenden Stoffe
des Wolligen Milchlings,
Lactarius vellereus FRIES**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Philipps-Universität zu Marburg



vorgelegt von

Herwig Hackenberg
aus Unter Sandau bei Marienbad

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Philipps-Universität Marburg/Lahn

als Dissertation angenommen am: 18. Oktober 1967

Tag der mündlichen Prüfung: 1. November 1967

Berichterstatter: Prof. Dr. P.H. List

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Böhme

Inhaltsübersicht

THEORETISCHER TEIL	Seite
Beschreibung der Pilze	5
Näher untersuchte Inhaltsstoffe	8
Bisher bekannte Eigenschaften des scharf schmeckenden Prinzips	25
E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n	27
Reindarstellung des scharf schmeckenden Prinzips, der Scharfstoffe 1 und 2	27
Trennungsgang mit Hilfe der Säulenchromatographie	34
Verbesserter Trennungsgang mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie	37
Weitere Versuche der Reindarstellung der Scharfstoffe 1 und 2	42
Vorschlag eines neuen Weges der Isolierung	45
Untersuchung der beiden Scharfstoffe	47
Diskussion der Spektren der beiden Scharfstoffe	65
Zusammenfassung	80
 PRAKTISCHER TEIL	
Allgemeine Hinweise	83
Vergleichende Extraktion des Pressaftes mit verschiedenen Lösungsmitteln	85
Herstellung des Benzolextraktes aus dem Milchsaft	85
Abtrennung der Fettsäuren aus dem Benzolextrakt	85
Bereitung der Säulen zur Chromatographie des Benzolextraktes	86
Chromatographie des vorgereinigten Benzolextraktes	87
Herstellung der Platten für die präparative Schichtchromatographie	88
Trennung und Isolierung der Scharfstoffe mittels der präparativen Schichtchromatographie	88
Dichtebestimmung	89
Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon des Scharfstoffes 2	89
Reduktion des Scharfstoffes 2 mit Natriumborhydrid	90
Versuchte Oxydation von Scharfstoff 2	91

THEORETISCHER THEIL

Schon häufig erweckten die sehr ähnlich aussehenden Pilze Pfeffermilchling und Wolliger Milchling wegen ihres brennend scharfen Geschmacks besonderes Interesse. Bisher wurde jedoch das scharf schmeckende Prinzip dieser höheren Pilze nicht näher erkannt und aus ihnen keine Substanz isoliert, die diese Sinneswahrnehmung hervorruft. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, festzustellen, worin dieser scharfe Geschmack begründet ist.

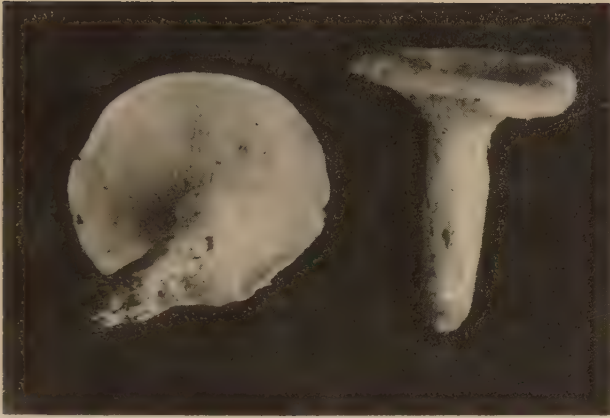
Zunächst folgt eine kurze Beschreibung der Pilze (1-6).

B E S C H R E I B U N G D E R P I L Z E

Der P f e f f e r - M i l c h l i n g , *Lactarius piperatus* FRIES ex SCOPOLI 1772 (Bd. III), auch Pfefferschwamm, weisser Kuhpilz, Bitterling genannt, stellt einen weissen, grossen derbfleischigen Pilz dar, der reichlich weissen Milchsafte enthält. Der Hut ist meist ziemlich regelmässig, 5 bis 15 (20) cm breit, trocken, glatt, kahl, jung flach gewölbt bis abgeflacht, anfangs mit stark eingerolltem Rand, dann niedergedrückt bis trichterförmig vertieft, weiss bis elfenbeinfarbig, zuweilen etwas bräunlich fleckend. Die Lamellen stehen sehr dicht, sind sehr schmal gabelig zweispaltig weiss-

lich bis gelblich und laufen am Stiel etwas herab. Der Sporenstaub ist weiss, die Spore beinahe kugelig, rauhlich und 6 bis 8,5 μ gross. Der Stiel ist schlank und kräftig, 3 bis 6 (10) cm hoch, kahl oder etwas grubig, voll und starr, oft exzentrisch und abwärts etwas verjüngt. Das Fleisch ist weiss, hart, starr, mit reichlichem, sehr scharfem, weissem Milchsaft. Der Geruch ist schwach aromatisch. Der Pilz kommt vorwiegend in Laubwäldern, besonders unter Buchen, häufig bis massenhaft vom Juli bis Oktober vor.

Der Wollige Milchling, *Lactarius vellereus* FRIES 1821, auch Wollschwamm, Erdschieber, genannt, stellt einen schmutzigweissen, groben, derben Pilz dar mit reichlich weissem Milchsaft. Der Hut ist meist unregelmässig verbogen 10-20 (30) cm breit, anfangs mit eingerolltem Rand; bald ausgebreitet und trichterförmig vertieft, kalkweiss, später schmutzigweiss bis weisslich gelb, mit dicht wollig-filziger, später kahler Oberfläche, sehr starr und derbfleischig. Die Lamellen stehen ziemlich weit voneinander entfernt, oft gabelig, schmal, am Stiel etwas herablaufend, weisslich bis gelblich. Die Sporen sind rundlich 9-10/6-9 μ , zartstachelig. Der Stiel ist kurz und dick, 2-6 cm hoch, 3-5 (6) cm dick, fest und kompakt, voll, fein filzig, später kahl, weiss, später



Pfeffer-Milchling
Lactarius piperatus FRIES



Wolliger Milchling
Lactarius vellereus FRIES

schmutzig weisslich. Das Fleisch ist weiss, derb und hart, körnig, mit reichlichem, sehr brennend scharfem, weissem Milchsaft. Dieser Pilz kommt in Laub- und Nadelwäldern, meist truppenweise oder in grossen Scharen von (Juli) August bis November vor.

Sehr leicht können diese beiden Pilze mit dem M i l c h l i n g s t ä u b l i n g, *Russula delica* FRIES 1838, auch Erdschieber genannt, verwechselt werden. Letzterer enthält jedoch keinen Milchsaft. Der Hut ist 8-15 (25) cm breit, in jungem Zustand eingetieft, später trichterförmig vertieft mit eingerolltem Rand, kalkweiss bis schmutziggelb. Die Lamellen sind schmal, kurz herablaufend, weiss mit blaugrünem Schimmer, oft mit ausgeschiedenen Wasserperlen besetzt. Der Stiel ist kurz (2-4 cm hoch) und dick, sehr hart, weisslich, an der Ansatzstelle der Lamellen meist bläulich-grün. Das Fleisch ist trocken, fest, mit mildem Geschmack, im Alter heringsartig riechend und bald stark wurmstichig ¹. Dieser Pilz kommt einzeln oder in kleinen Gruppen in Laub- und Nadelwäldern von Juli bis Oktober vor.

¹ Der Pfeffermilchling und der Wollige Milchling wurden bei meinen Sammlungen nie von Maden befallen gefunden, es sei denn in seltenen Fällen, dass der Pilz vorher anderweitig beschädigt wurde und austrocknete.

N A E H E R U N T E R S U C H T E I N H A L T S -
S T O F F E

Obwohl die beiden Pilze *Lactarius piperatus* und *Lactarius vellereus* bereits häufig Anlass zu chemischen Untersuchungen waren, gibt es bisher keine Zusammenstellung dieser Arbeiten. Einige der Veröffentlichungen kamen dadurch zustande, dass einerseits vorangegangene Arbeiten eines anderen Autors nicht berücksichtigt wurden, obwohl sie das gleiche Untersuchungsergebnis erbrachten und andererseits Veröffentlichungen über ein Arbeitsergebnis eines Autors manchmal sogar mit gleichem Wortlaut in verschiedenen Zeitschriften ohne Hinweis abgedruckt wurden.

Bereits im Jahre 1797 findet sich in den *Annales de chimie* folgende kurze Bemerkung: "L'agaric poivré contient beaucoup de principe âcre et infiniment d'alumine; il donne de l'ammoniaque en grande quantité par la distillation à fer nud."

Auf dieser Zusammenfassung einer Arbeit von TROMMSDORFF (7) aufbauend befasst sich H. BRACONNOT (8) im Jahre 1811 im Rahmen seiner Pilzuntersuchungen auch mit dem *Lactarius piperatus*. Trotzdem das Ergebnis dieser Arbeit aus der heutigen Sicht unbefriedigend ist, war sie sehr lange massgebend, zumal BRACONNOT die ersten eingehenden Pilzuntersuchungen durchführte. Zu-

sammenfassend enthält *Lactarius piperatus* nach BRACONNOT (8) folgende Bestandteile: 1. Wasser, 2. Fungin ¹, 3. Albumin, 4. Gelatine, 5. viel fettartige Substanzen (adipocire ²), 6. Kaliumacetat, 7. eine besondere Zuckerart ³ ("die trotz Verunreinigung kristallisiert"), 8. Kaliumphosphat, 9. eine Pflanzensäure, "in besonderer Weise an Kalium gebunden", 10. ölige Substanzen, 11. ein schnell verschwindendes Prinzip, 12. Kaliumchlorid.

Die in den beiden Pilzarten vorkommenden S ä u r e n stellen die am meisten untersuchte Substanzgruppe dar.

P. BOLLEY (10) stellt 1855 fest, dass die von BRACONNOT (8) u.a. in *Lactarius piperatus* gefundene Pflanzensäure (später Boletsäure) offensichtlich Fumarsäure darstellt. Im gleichen Jahr bestätigt dies DESSAIGNES (11) und findet, dass die von BRACONNOT (8) weiter angegebene Funginsäure ein Gemisch aus Aepfelsäure, Citronensäure und Phosphorsäure darstellt.

Im Jahre 1883 wurde von Th. BISSINGER (17) in *Lactarius piperatus* eine Fettsäure der Zusammensetzung $C_{15}H_{30}O_2$, mit einem Schmelzpunkt von 69-70° festgestellt, die er als identisch mit der schon früher von W. THOERNER

¹ Eine Literaturzusammenstellung der Arbeiten bis zur Feststellung, dass Fungin Chitin darstellt, findet sich bei JULIUS ZELLNER, Chemie der höheren Pilze, Leipzig 1907, Seite 123 ff.

² Später im wesentlichen als Stearinsäure erkannt. BRACONNOT bemerkt, dass die daraus gewonnenen Kristalle sehr ähnlich einer Substanz sind, die man aus Walrat erhält.

³ Später als Mannit erkannt.

(19) hier in Marburg 1879 aus *Agaricus integer*¹ (Speitäubling) isolierten Säure erkennt. Diese Säure finden im Jahre 1889 nochmals CHODAT und CHUIT (20) in *Lactarius piperatus*. Die Autoren machen die gleichen Angaben wie BISSINGER (17) ohne ihn anzuführen und beziehen sich auch wie BISSINGER auf THOERNER (19).

Die Autoren CHODAT und CHUIT (20) fanden die Säure mit der Summenformel $C_{15}H_{30}O_2$ in *Lactarius piperatus* in grossen Mengen und schlagen daher vor, sie Lactarsäure zu nennen². Weiter fanden sie auch Bernsteinsäure.

P.H. CHUIT (21) befasst sich im gleichen Jahr, also 1889, nochmals mit dieser Lactarsäure genannten Säure. Der Autor stellt verschiedene Derivate dar, vergleicht diese mit den entsprechenden Derivaten der Stearinsäure und äussert sogar seine Verwunderung über das Uebereinstimmen der Daten. Als Stearinsäure erkennt er sie jedoch nicht.

Erst E. GERARD (25) isoliert 1891 aus dem Fett von *Lactarius piperatus* eine Säure, die er mit Stearinsäure identifiziert. Der Autor fand erstmalig die Stearinsäure auch im *Lactarius vellereus* und isolierte weiter aus beiden Pilzarten Ameisensäure, Essigsäure, Buttersäure, Oelsäure und Phosphorsäure.

GERARD (25) führt die vorangegangenen Arbeiten von

¹ heute *Russula emetica*

² siehe Seite 12

TH. BISSINGER (17) und CHODAT und CHUIT (20) nicht an, da er sie wahrscheinlich nicht kannte [BOUGAULT und CHARAUX (36)].

Im Jahre 1911 beziehen sich J. BOUGAULT und C. CHARAUX (34) auf die Arbeit von E. GERARD (25) und isolieren aus verschiedenen Lactariusarten, jedoch nicht aus Lactarius piperatus und Lactarius vellereus, eine neue Säure, die mit der von THOERNER (19) und BISSINGER (17) gefundenen Säure nicht identisch ist. Diese neue Säure wird jedoch auch Lactarinsäure genannt und als eine Ketostearinsäure der Bruttoformel $C_{18}H_{34}O_3$ identifiziert.

Noch im gleichen Jahr folgt eine weitere Veröffentlichung von BOUGAULT und CHARAUX (35), wo sie feststellen, dass die Lactarinsäure eine 6-Ketostearinsäure darstellt. Die Autoren führen mit dem Oxim eine Beckmann-Umlagerung durch und hydrolysieren das entstehende Produkt, wobei sie Adipinsäure, n-Tridecansäure, $CH_3(CH_2)_{11}COOH$, n-Tridecylamin, $CH_3(CH_2)_{11}NH_2$, und 5-Amino-n-valeriansäure erhielten.

BOUGAULT und CHARAUX (36) machen 1912 quantitative Angaben über das Vorkommen der Lactarinsäure (6-Ketostearinsäure) in verschiedenen Lactariusarten; sie fanden jedoch diese Säure in Lactarius piperatus nicht. Die Verfasser isolieren die mit THOERNER (19) und BISSINGER (17) identische Säure, identifizieren sie genauso wie J. ZELLNER (37) 1913 aufgrund dieser

Arbeit, nochmals als Stearinsäure und bestimmen sie im *Lactarius piperatus* und *Lactarius vellereus* quantitativ.

BOUGAULT und CHARAUX (36) bemerken, dass die von THOERNER (19), BISSINGER (17), CHODAT und CHUIT (20) gefundene und von letzteren Autoren als Lactarsäure bezeichnete Säure nichts anderes als Stearinsäure darstellt. Sie fordern daher, dass der Name Lactarsäure für die ursprüngliche Bedeutung ¹ aus der chemischen Literatur entfernt werde.

G.M. ROBINSON und R. ROBINSON (39) bestätigen 1925, dass die von BOUGAULT und CHARAUX (34-36) gefundene, in *Lactarius spec.* natürlich vorkommende Lactarinsäure eine 6-Ketostearinsäure darstellt. Durch Kondensation von Na-2-Acetyl-n-tridecylsäure-äthylester mit 5-Carbäthoxyvalerylchlorid erhielten die Autoren den entsprechenden Ester, der nach Verseifung die 6-Ketostearinsäure ergab.

Die 6-Ketostearinsäure (Lactarinsäure) fand schliesslich J.L. BONNET (51) auch in *Lactarius vellereus*.

In seiner gross angelegten Arbeit veröffentlicht der Autor im Jahre 1959 seine Untersuchungen, die er an 96 Pilzarten durchführte. Mit Hilfe verschiedener Methoden der Papierchromatographie fand er weiter in *Lactarius vellereus* Myristinsäure, Palmitinsäure, nochmals Stearinsäure und die Aminosäuren α -Alanin,

¹ s. Seite 10

β -Alanin, Lysin, Tyrosin und Valin.

Umfassender und genauer untersuchte J. SZYMCZAK (55) 1962 die Zusammensetzung der Aminosäuren in einigen essbaren Pilzen und so auch in *Lactarius vellereus*. Der Autor fand im Hydrolysat des isolierten Eiweisses durch Vergleich mittels verschiedener Methoden der Papierchromatographie folgende Aminosäuren: Cystein, Lysin, Histidin, Arginin, Serin, Threonin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, α -Alanin, Prolin, Valin, Methionin, Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin, iso-Leucin. Im Hydrolysat des aus dem Pilz nicht isolierten Eiweisses wurde noch β -Alanin gefunden.

Den Gehalt an Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure in *Lactarius piperatus* untersuchte T.A. KEZELI und L.I. DZHAPARIDZE (43) 1944. Sie stellten fest, dass im frischen, in Gruzinien gesammelten, *Lactarius piperatus* 21 mg Ascorbinsäure, 1 mg Dehydroascorbinsäure und im getrockneten Pilz 210 mg Ascorbinsäure, 15 mg Dehydroascorbinsäure in je 100 g enthalten sind.

Von den b a s i s c h e n I n h a l t s s t o f f e n wurden folgende untersucht.

J. ZELLNER (37) fand bei seiner Arbeit über *Lactarius piperatus* Cholin. E. STEIN von KAMIENSKI (49) schreibt 1958 in seiner Arbeit über die Amine in Pilzen, dass er u.a. in *Lactarius vellereus* Methylamin und Aethanol-

amin nachgewiesen hat.

W. WOLF und O.E.R. ZIMMERMANN (16) befassen sich 1871 mit der Ausscheidung von Ammoniak durch Pilze. Ihre Untersuchungen, die sie genau wie EL. BORŠČOV (14) u.a. an *Lactarius piperatus* durchführen, zeigen, dass bei normaler Vegetation die Pilze kein Ammoniak ausscheiden und dieses nur als Fäulnisprodukt der Pilze entsteht.

Eine weitere, oftmals untersuchte Substanzgruppe stellen die Z u c k e r dar.

Nachdem BRACONNOT (8) 1811 das Vorkommen "einer besonderen Zuckerart die trotz Verunreinigung kristallisiert" in *Lactarius piperatus* festgestellt hatte, fanden KNOP und SCHNEDERMANN (9) 1844 und danach P. BOLLEY (10) 1853 in diesem Pilz Mannit. Das Vorkommen von Mannit in *Lactarius piperatus* stellen später noch mehrere Autoren fest, ohne KNOP und SCHNEDERMANN (9) und BOLLEY (10) zu nennen. So u.a. CHODAT und CHUIT (20) 1889, die 7,2% Mannit im getrockneten Pilz fanden.

Nachdem A. MUENTZ (23) 1873-1874 in verschiedenen Pilzarten Trehalose nachgewiesen hatte, befasste sich E. BOURQUELOT (22) 1889 mit dem Vorkommen von Mannit und Trehalose in verschiedenen *Lactarius*arten und bestimmt beide Zucker quantitativ in *Lactarius piperatus* und

Lactarius vellereus.

BOURQUELOT (29) untersuchte 1894 u.a. in *Lactarius piperatus* polymere Kohlehydrate und isoliert als deren Bestandteile Dextrose und Mannose. W. MARME (12) äussert 1864 im Zusammenhang mit einer Untersuchung des Vorkommens von Inosit in der Pflanzenwelt die Vermutung, dass auch *Lactarius piperatus* Inosit enthält. J. ZELLNER (37) stellte in diesem Pilz Inosit fest, weiter Glucose und auch Mannit. J.L. BONNET (51) fand 1959 in *Lactarius vellereus* ebenfalls Trehalose und Mannit, ohne die vorangehenden Autoren zu nennen.

Die F e r m e n t e der beiden Pilze fanden oft Interesse.

CHODAT und CHUIT (20) stellen in ihrer Veröffentlichung im Jahre 1889 erstmalig die Vermutung auf, dass im *Lactarius piperatus* ein Ferment für das schnelle Verschwinden des scharfen Geschmacks verantwortlich ist. E. BOURQUELOT und G. BERTRAND (30) weisen 1896 u.a. in *Lactarius piperatus* und *Lactarius vellereus* ein oxydierendes Ferment mit Quajakharztinktur nach. Darauf untersucht noch im gleichen Jahr E. BOURQUELOT (31) in verschiedenen Pilzarten und auch wieder in *Lactarius piperatus* und *Lactarius vellereus* das mittels

Guajak tinktur nachgewiesene Ferment und stellt fest, dass dieses auch immer auf Tyrosin wirkt.

R. CHODAT und A. BACH (32) gelang es 1902 aus den Pilzen *Russula foetens* und *Lactarius vellereus* eine Oxydase zu gewinnen, die neben den damals bekannten Oxydasereaktionen auch Jod aus angesäuerten Jodkaliumlösungen freizusetzen vermag.

H. WIELAND und H. SUTTER (40) berichten 1928, dass sie aus *Lactarius vellereus* eine Phenoloxydase isolierten. 1 g des dargestellten Präparates ist rund 630mal wirksamer als 1 g Pilzbrei. 1 mg des gereinigten Fermentes oxydiert in 10 Minuten 4 mg Hydrochinon zu Chinon. Wird die wässrige Lösung auf 100° erhitzt, so ist die Wirksamkeit nach 3 Minuten zerstört.

H.R. DALTON und J.M. NELSON (42) veröffentlichen 1938 ihre Arbeiten, die zur Isolierung von Tyrosinase aus *Lactarius piperatus* führten¹. Es wurde Tyrosinase erhalten, die im reinsten Präparat 0,23% Kupfer enthielt, ein Trockengewicht von 1 mg pro 1000 Kresolaseeinheiten und 0,0027 µg Kupfer pro Kresolaseeinheit hatte. Ein UV-Spektrum von der erhaltenen Tyrosinase und Vergleichssubstanz wird von den Autoren angegeben und diskutiert.

T. HIGUCHI et al. (46) untersuchten 1956 den Einfluss der von den Pilzen produzierten Polyphenol-

¹ s. BOURQUELOT (31) auf Tyrosin wirksames Ferment (1896)

oxydasen auf die Verrottung von Holz. Zu diesem Zweck haben sie aus verschiedenen Pilzarten, u.a. aus *Lactarius piperatus* konzentrierte Enzymlösungen hergestellt.

G. LEGRAND (47) veröffentlichte 1957 zwei Untersuchungen über ein Indol-3-essigsäure oxydierendes Enzymsystem, das aus verschiedenen *Lactarius*-arten: *Lactarius plumbeus*, *Lactarius vellereus*, *Lactarius quiteus* und *Lactarius chrysorheus* gewonnen wurde. Nach seinen Angaben besitzen die Enzympräparate die Aktivität von saurer Laccase.

G. LEGRAND und G. MARTIN (48) befassten sich 1958 erneut mit dem aus verschiedenen *Lactarius*-, *Russula*- und *Agaricus*-arten, u.a. aus *Lactarius vellereus* isolierten Oxydase-Präparaten, die die Oxydation der Polyphenole, des p-Phenylendiamins und der Ascorbinsäure in saurer Lösung katalysieren. Die Eigenschaften der Substrate weisen darauf hin, dass das Enzym mit der Laccase verwandt ist. Die Autoren untersuchen das pH-Optimum des Enzyms, das je nach Pilzart verschieden ist und nehmen an, dass es sich je nach Pilzart um ein Gemisch von zwei sehr nahe stehenden Enzymen handelt: einer "normalen" und einer "sauren" Laccase, die durch Reinigung nicht trennbar sind.

Von den nicht genauer charakterisierten Stoffen isolierte 1932 D. AYE (41) durch Destillation aus 20 kg *Lactarius piperatus* 0,5 g ätherisches Oel, das dunkelbraun ist und den eigentümlichen scharfen Geruch des frischen Pilzes hat ¹ (es ist schwefelhaltig, S Z 29, E Z 223). E. GERARD (27) stellt 1892 fest, dass das Ergosterin und Cholesterin aus *Lactarius vellereus* und *Lactarius piperatus* die gleichen Reaktionen geben wie das Ergosterin von C. TANRET (26).

In mehreren Untersuchungen wurde *cis*-Polyisopren isoliert.

W.D. STEWART et al. (45) isolierten 1955 u.a. aus einem Gemisch von verschiedenen *Lactarius*-arten ein *cis*-Polyisopren, das im getrockneten Pilzgemisch zu 1,7% enthalten ist. Durch Vergleich der IR-Spektren konnte von den Autoren sichergestellt werden, dass das aus diesen Pilzen isolierte *cis*-Polyisopren identisch ist mit dem aus *Hevea brasiliensis*.

Im Jahre 1961 folgt eine Veröffentlichung von R.F. ANDERSON et al. (52), die aus dem Sporokarp von *Lactarius*-Arten geringe Mengen von *cis*-Polyisopren isolierten und dies durch Vergleich der IR-Spektren mit einem Präparat aus *Hevea brasiliensis* Muell. nachwies.

¹ Die von mir isolierten Scharfstoffe 1 und 2 sind geruchlos

sen. *Lactarius piperatus* (trocken) enthält 0,24% cis-Polyisopren mit einem Molgewicht 87100 bzw. 91000.

K. KURIHARA et al. (53) veröffentlichen 1962, dass sie in allen von ihnen untersuchten ca. 400 Pilzarten, u.a. in verschiedenen *Lactarius spec.* das gleiche cis-1,4-Polyisopren fanden, wie es in *Hevea brasiliensis* vorkommt.

Die gleichen Autoren berichten in einer weiteren Veröffentlichung 1963, dass 12 *Lactarius species*, u.a. *Lactarius piperatus*, im Fruchtkörper das cis-1,4-Polyisopren enthalten. Während der Milchsaft des Sporokarps von *Lactarius volemus* ungefähr 10% Kautschuk (rubber components) enthält, enthalten *Lactarius piperatus* und *Lactarius flavidulus* keinen Kautschuk (rubber components) in ihrem Milchsaft.

K. KURIHARA, K. KATO, S. NANAJI (54) erhalten schliesslich für ihr Extraktionsverfahren von cis-1,4-Polyisopren aus *Lactarius volema*, der 2,5% des cis-1,4-Polyisoprens enthält, ein Patent.

Die wohl am meisten interessierende Eigenschaft der Pilze *Lactarius piperatus* und *Lactarius vellereus* stellt das brennend scharf schmeckende Prinzip dar.

Es folgt auch hier eine Uebersicht der Arbeiten, die

sich um dieses scharf schmeckende Prinzip bemühten, jedoch zu keinem Resultat geführt haben.

TROMMSDORFF (7) bemerkt 1797, dass der *Lactarius piperatus* viel eines scharfen Prinzips enthält.

BRACONNOT (8) gewinnt bei seiner Arbeit aus dem ausgepressten Milchsafte von *Lactarius piperatus* durch Erhitzen eine albuminartige Substanz, wobei er bemerkte, dass der Saft in der Hitze seine Schärfe vollständig verloren hatte. Der Pilz verliert auch seinen scharfen Geschmack durch Trocknen bei Wärme.

EMILE BOUDIER (13) schreibt 1867 in seiner Monographie "Die Pilze", dass er eine Reihe *Lactarius*-arten untersucht habe und führt die Schärfe der Pilze auf ein Harz, das im Milchsafte in Suspension vorliegt, zurück. Weiter stellt der Autor fest, dass das scharfe Prinzip durch Kochen und zum Teil durch Trocknen zerstört wird.

Wesentlich später, und zwar 1889, stellen CHODAT und CHUIT (20) bei ihren Untersuchungen von *Lactarius piperatus* fest, dass der Pfeffergeschmack des Milchsaftes nach wenigen Minuten verschwand, wenn dieser in Anwesenheit von Luft mit Wasser vermischt wurde. Beim Einengen des Milchsaftes konnten sie jedoch das Verschwinden des scharfen Geschmackes nicht beobachten. Frische Pilze von intensivem Pfeffergeschmack, zerrieben und zerstoßen, wurden einen Tag lang stehengelassen. Der Pfeffergeschmack verschwand nach dieser Zeit voll-

ständig. In diesem Zusammenhang untersuchen und beschreiben die Autoren ausführlich die Milchröhren in *Lactarius piperatus*, die sehr stark verzweigt sind. Zum Beobachten der Milchröhren werden Präparate mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt, wobei die Milchröhren wegen ihrer Verharzung nur langsam angegriffen werden.

Es wird bemerkt, dass dieser Pilz schwer vermodert; wenn er alt ist, so schrumpft er ein und vertrocknet ¹. Weiter ist aus dem alkoholischen Auszug eine braunschwarze, harzartige Substanz isoliert worden, "die nichts anderes ist als das Prinzip, das dem *Lactarius piperatus* seinen so starken Pfeffergeschmack verleiht. Wir haben (Autoren) diesem Prinzip den Namen Piperon gegeben." Sie schreiben: "Das Piperon ist bei gewöhnlicher Temperatur ein fast festes Harz, bei Handwärme erweicht es und bei 100° ist es flüssig. Es besitzt den scharfen, und den Rachen reizenden Geschmack des Pilzes. Mit Wasser, selbst bei Gegenwart von etwas Säure oder Alkali kann es ohne Veränderung erhitzt werden, was merkwürdig ist, wenn man bedenkt, wie leicht der Pilz selbst seinen pfefferartigen Geschmack u.a. bei kurzem Erhitzen mit Wasser verliert."

Sie schreiben weiter: "Es ist wahrscheinlich, dass sich in dem *Lactarius piperatus* ein Stoff, vielleicht ein Ferment ² befindet, das diese Veränderung des Pi-

¹Diese Beobachtung kann ich aufgrund meiner mehrjährigen Sammlung voll bestätigen (s. auch Fussnote S.7)

²Fermente wurden später mehrmals isoliert

perons hervorrufen kann. Eine Veränderung, die in so kurzer Zeit vor sich geht, dass wir, um ein wenig von dieser Substanz zu erhalten, die Extraktion des Pilzes mit Alkohol oder Aether sofort nach der Sammlung vornehmen mussten."

KOBERT (28) bemerkt 1891 in einer Abhandlung über Pilzgifte, dass alle *Lactarius*-arten im Milchsafte ein brennend schmeckendes und auf den Darmkanal wirkendes Harz enthalten.

A. ZEGA (33) untersuchte 1902 mehrere auf dem Markt in Belgrad angebotene Speisepilze. Bei *Lactarius piperatus* stellt er fest, dass der Pilz zubereitet seinen scharfen Geschmack verliert, jedoch immer einen, wenn auch ganz schwachen, bitterlichen Geschmack behält.

J. ZELLNER (37) isoliert aus *Lactarius piperatus* ein gelbliches Harz, dessen alkoholische Lösung durch Bleiacetat gelblich, durch Kupferacetat grünlich gefällt und durch FeCl_3 olivbraun gefärbt wird.

M. BARLOT (38) veröffentlicht 1921 seine Untersuchungen über ein neues Reagens für *Lactarius*- und *Russula*-arten mit scharfem Geschmack. Der Autor schreibt, dass nicht erforderlich ist, die *Lactarius*- und *Russula*-arten zu schmecken, sondern es reicht zur Charakterisierung der Schärfe die Reaktion mit Antimonpentachlorid aus. Auf diese Weise färbt sich das untersuchte Stück

Karpophor von *Lactarius piperatus* und *Russula emetica* bleigrau. Aus einigen kg der jeweiligen Pilze wurden mehrere g einer Substanz erhalten, die diese Eigenschaften zeigten. Diese Substanzen sind ziemlich instabil. Bei der Aufbewahrung in verschlossenen Röhren vergilbten sie nach und nach und verloren ihren Geschmack, "der zuerst ausserordentlich scharf und gepfeffert ist". Sie färben sich nicht mehr mit Antimonpentachlorid. Durch Kochen mit Wasser oder Alkohol werden sie zerstört. Die Extraktion der aktiven Substanzen erfolgt sehr bequem in der Kälte mit Aether. Es genügt die in Stücke geschnittenen Pilze 12-15 Stunden lang in Aether mazerieren zu lassen, wobei sich zwei flüssige Schichten bilden. Die ätherische Schicht gibt beim Abdampfen im Vakuum eine glänzend weisse Substanz. Diese ist kristallin, blättrig und stellt das aktive Prinzip dar ¹. Mit einer sehr kleinen Probe kann man die Antimonpentachlorid-Reaktion sehr schnell und sehr stark durchführen.

Auch als N a h r u n g s m i t t e l fanden die beiden Pilze trotz ihres brennend scharfen Geschmacks oftmals Interesse.

So bemerkt bereits 1811 BRACONNOT (8), dass das schnelle Verschwinden des scharfen Geschmacks durch

¹ Die von dem Autor isolierte weisse "Substanz" stellt das Gemisch der Fettsäuren, wesentlich Stearinsäure, dar, dem geringe Mengen der scharf schmeckenden Substanzen beigemengt waren.

Erhitzen bei *Lactarius piperatus* die Möglichkeit gibt, den Pilz als Nahrungsmittel zu verwenden. Später untersuchte N. SOCOLOFF (15) 1873 *Lactarius piperatus* als Nahrungsmittel und K.V. MARGEVIČ (18) macht 1883 in seiner Dissertation auch Angaben über *Lactarius piperatus*.

A. ZEGA (33) untersucht 1902 mehrere auf dem Markt in Belgrad angebotene Speisepilze. Hierunter fällt auch *Lactarius piperatus*, für den er folgende Angaben in Prozenten macht:

Wasser 85,70, Stickstoff 6,41, Fett 1,07, stickstofffreie Extraktstoffe 2,54, Rohfaser 3,30 und Asche 0,98. Eine genauere Ascheanalyse gibt BISSINGER (17) in seiner Dissertation bereits 1883 an.

ZEGA (33) schreibt, dass der Pilz von der Landbevölkerung sehr viel genossen wird und zwar meist gesalzen und gebraten.

In der neueren Literatur findet sich 1958 eine Bemerkung bei J. HERINK (50), dass die zweckmässigste Verwertung der *Lactarius*arten mit scharfem Geschmack in konserviertem Zustand, insbesondere durch Milchsäuregärung erfolgt.

So ist heute noch der *Lactarius piperatus* in der Sowjetunion offiziell zum Sammeln und zum Verkauf zugelassen: N.I. ORLOV (44) Seite 134. Der Autor zählt den *Lactarius piperatus* zu den bedingt essbaren Pilzen.

Und auch die oben angeführten Untersuchungen von SZYMCZAK (55), die er 1962 veröffentlicht, erfolgen mit dem Ziel den Nährwert u.a. von *Lactarius velle-reus* festzustellen, den er unter den essbaren Pilzen aufführt.

Bisher bekannte Eigenschaften des scharf schmecken- den Prinzips.

Die vor meinen Untersuchungen bekannten Eigenschaf-
ten des scharf schmeckenden Prinzips waren:

1. sein schnelles Verschwinden unter den ver-
schiedensten Bedingungen;
2. seine Löslichkeit in organischen Lösungs-
mitteln; und
3. seine Anfärbbarkeit mit Antimonpentachlorid.

Das schnelle Verschwinden des scharfen Geschmacks,
das mehrere Autoren angeben (8, 13, 20, 33, 38), muss
ich voll bestätigen und zwar solange sich die scharf
schmeckenden Stoffe in dem aus den Pilzen ausgepress-
ten Milchsaft befinden. Die von CHODAT und CHUIT (20)
und ZELLNER (37) isolierte harzige Masse erhielt ich
auch. Die Pilze hatte ich mit Aethanol extrahiert
und diesen Extrakt weitgehend eingeengt. Beim Aus-
schütteln mit Aether schied sich an der Grenze zw-
ischen der Aether- und Wasserschicht diese harzige
Masse ab. Den charakteristischen Geschmack, wie

CHODAT und CHUIT (20) angeben, wies sie jedoch nicht auf.

Etwas genauer hingegen sind die Untersuchungen von BARLOT (38) 1921. Er stellt fest, dass das scharf schmeckende Prinzip mit Aether extrahierbar und mit Antimonpentachlorid anfärbbar ist. Dies ist insofern interessant, als ich später Antimonpentachlorid in Chloroform als ausgezeichnetes Detektionsmittel bei der Dünnschichtchromatographie für die scharf schmeckenden Stoffe verwenden konnte.

Für die Begriffsbestimmung eines scharf schmeckenden Stoffes bzw. einer scharf schmeckenden Substanz möchte ich im weiteren Text den Ausdruck Scharfstoff verwenden. Es gibt zwar nur die vier Geschmacksqualitäten: süß, sauer, bitter und salzig. Jedoch stellt der scharfe Geschmack einen unspezifischen Reiz auf der Zunge dar und ist als schmerzend brennendes Gefühl wahrzunehmen.

Zur Charakterisierung einer Substanz, die diese Wahrnehmung auf der Zunge hervorruft, will ich den Ausdruck Scharfstoff verwenden.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

In der hiesigen und weiteren Umgebung von Marburg konnte ich im wesentlichen *Lactarius vellereus* sammeln und so führte ich die Untersuchungen an diesem Pilz aus.

Reindarstellung des scharf schmeckenden Prinzips, der Scharfstoffe 1 und 2

Da das Ausgangsmaterial nur in einem relativ kurzen Zeitraum zu beschaffen ist, ergab sich die Frage der sofortigen Verarbeitung bzw. Konservierung.

Die ersten gesammelten Pilze konservierte ich in 90%-igem Aethanol. Nach einer Mazerationsdauer von ca. vier Wochen wurden die Pilze abgetrennt und ausgepresst. Dieser Extrakt wies jedoch keinerlei scharfen Geschmack auf und auch der Pressrückstand schmeckte nicht mehr scharf.

In einem weiteren Versuch fror ich die Pilze bei -20° in einer Gefriertruhe ein. Zu meiner Ueberraschung schmeckten selbst markierte Exemplare, die vor dem Einfrieren sehr scharf geschmeckt hatten, nach dem Auftauen überhaupt nicht mehr scharf.

Auch der Versuch, die gefrorenen Pilze in einem Fleischwolf zu zerkleinern, und sofort zum Auftauen in 96%iges Aethanol einzubringen, schlug fehl. Der Extrakt dieser Pilze schmeckte nicht scharf. Da das scharf schmeckende Prinzip in dem beim Verletzen der Pilze austretenden weissen, reichlichen Milchsaff enthalten ist, presste ich diesen aus, um ihn zu extrahieren. Durch Ausschütteln mit Aether konnte so ein weisses, glänzendes, scharf schmeckendes Gemisch erhalten werden, das bereits BARLOT (38) 1921 auch erhalten hatte und im wesentlichen Stearinsäure darstellt, der eine geringe Menge der Scharfstoffe beigemischt war.

Trotzdem war dies zunächst der brauchbarste Weg, und so zerkleinerte ich mit Hilfe des Fleischwolfes (Gusseisen) ca. 24 kg Pilze und presste diese mit einer Tinkturenpresse (Gusseisen) aus. Die zunächst graue Suspension wurde zusehends dunkler und während des Ausschüttelns mit Aether wurde sie sogar fast schwarz. Das Ergebnis der Ausschüttelung war gegenüber dem im kleinen Massstab durchgeführten Vorversuchen nicht befriedigend. Das schnelle Dunkelwerden des Presssaftes und das gleichzeitige Verschwinden des scharfen Geschmacks deutete auf eine fermentative Oxydation. Dies vermuteten auch CHODAT und CHUIT (20) bereits 1889, und in einer ganzen Reihe von Arbeiten in spä-

teren Jahren wurden aus *Lactarius piperatus* und *Lactarius vellereus* verschiedene oxydierende Fermenten isoliert (30-32, 40, 42, 46-48). Meine Beobachtungen beim Zerkleinern und Auspressen ergaben eine zeitliche Abhängigkeit des Dunkelwerdens mit der Intensität der Berührung der Pilze bzw. des Pressaftes mit Eisen. So unterliess ich in einem weiteren Arbeitsgang die Zerkleinerung mit Hilfe des gusseisernen Fleischwolfes und presste zwölf mittelgrosse Pilze (à 80-100 g) schnell aus. Nach Extraktion des fast weissen Pressaftes mit Aether, Trocknen mit Natriumsulfat und Einengen konnte ein zur Kristallisation neigender, fast farbloser Rückstand erhalten werden. Hieraus konnten, durch fraktionierte Kristallisation im Kühlschrank mehrmals weisse Kristalle abgetrennt werden, die jedoch nicht deutlich scharf schmeckten und hauptsächlich Stearinsäure darstellten. Die Hälfte der scharf schmeckenden Mutterlauge wurde in eine 68 cm lange Säule mit einem inneren Durchmesser von 2,5 cm auf eine Kieselgelschicht aufgetragen und mit dem Fließmittel Benzol-Essigsäureäthylester (95+5) chromatographiert. Von den 58 aufgefangenen Fraktionen zu je 20 ml schmeckten die Fraktionen 29-34 scharf. Die Kontrolle zur Vereinigung der Fraktionen wurde auf Kieselgel G-Platten geführt, die mit dem gleichen Laufmittel entwickelt und mit Antimonpentachlorid in Chlo-

reform besprüht wurden.

Im darauffolgenden Jahr konnte ich den letzten Versuch, jedoch ohne die Säulenchromatographie, mit gleichem Ergebnis wiederholen. Der dünnschichtchromatographische Vergleich ergab einen scharf schmeckenden Fleck mit einem Rf-Wert von 0,50.

Den ätherischen Extrakt des Pressaftes trug ich auf eine mit Kieselgel G beschichtete 20 x 20 cm Platte in einem langen Streifen auf und teilte die eine Hälfte der Platte nach dem Entwickeln mit obigem Laufmittel und Abdunsten desselben in Streifen zu je 1 cm quer zur Laufrichtung ein. Durch Geschmacksprobe des aus den Feldern herausgekratzten Kieselgels und anschließendes Besprühen der zweiten Hälfte der Platte mit Antimonpentachlorid in Chloroform, konnte der Scharfstoff auf der Platte unter den 16 Flecken lokalisiert werden - er zeigte nach dem Besprühen eine braungraue Färbung und einen Rf-Wert von 0,50.

Da sich dieser Fleck mit anderen leicht überdeckte, suchte ich ein anderes Laufmittelgemisch und probierte die auf der nächsten Seite in einer Tabelle zusammengestellten Laufmittel aus:

Nr.	Laufmittel-Gemisch	Trennung
1	Benzol-Methanol (95+5)	trennt schlecht
2	Benzol-Essigsäureäthylester (92,5+7,5)	trennt schlecht
3	Benzol rein	keine Trennung
4	Benzol-Methanol-Essigsäure-äthylester (95+5+5)	keine Trennung
5	Cyclohexan-Essigsäureäthylester (95+5)	keine Trennung
6	Benzol-Dioxan-Essigsäure-äthylester (90+25+4)	keine Trennung
7	Cyclohexan-Chloroform-Eisessig (70+20+10)	trennt gut
8	Cyclohexan-Chloroform-Essigsäureäthylester (70+20+10)	trennt gut
9	wie 8 (60+20+20)	trennt sehr gut
10	Benzol-Chloroform-Essigsäure-äthylester (70+20+10)	keine Trennung

Bei den vorherigen Untersuchungen mit dem Laufmittel Benzol-Essigester (95+5) konnte ich mehrfach beobachten, dass der untere Rand des Scharfstofffleckes etwas mehr braun gefärbt war. Mit dem Laufmittel Cyclohexan-Chloroform-Essigsäureäthylester (60+20+20) konnte dieser Fleck in zwei Flecken getrennt werden, die beide bei der Geschmacksprobe des herausgekratzten Kieselgels sehr scharf schmeckten, die Zone zwischen diesen beiden Flecken jedoch nicht.

Beide Flecken liessen sich auch mit Antimonpentachlorid in Chloroform gut anfärben und zeigten einen R_f -Wert

von

1. 0,40.....graubrauner Fleck,
2. 0,48.....grauvioletter Fleck.

In den weiteren Ausführungen sei zuerst der Stoff mit dem Rf-Wert 0,40 Scharfstoff 1 und der mit dem

Rf-Wert 0,48 Scharfstoff 2 bezeichnet.

Da bei der Extraktion des Pressaftes mit Aether sehr starke Emulsionsbildung auftrat, wurde versucht mit Benzol und Methylenchlorid zu extrahieren. Mit diesen sauerstofffreien Lösungsmitteln bildeten sich zwar auch recht beständige Emulsionen, sie liessen sich jedoch mit gutem Erfolg auf der Zentrifuge trennen.

Um gleichzeitig zu untersuchen, ob beide oben festgestellten Scharfstoffe auch ursprünglich im Pilz vorhanden sind, wurde mit eisgekühlten Lösungsmitteln und so schnell wie möglich gearbeitet. Die vergleichende Extraktion zeigte, dass mit Benzol wesentlich mehr der Scharfstoffe extrahiert werden konnte, als mit Aether. Mit Methylenchlorid jedoch nur ganz geringe Mengen. Weiter konnte ich bei diesen Versuchen trotz schnellem Arbeiten mit gekühlten Lösungsmitteln auf den Dünnschichtchromatogrammen beide Flecken feststellen, die den zwei Scharfstoffen entsprachen. Zu diesen Versuchen konnte ich eine aus einer Aluminiumlegierung bestehende Tinkturenpresse ¹ verwenden.

¹ 2,5 l Hafico-Presse, Hersteller Hans Fischer u. Co., Düsseldorf.

Gegenüber den vorangegangenen Versuchen wurde so das Einschleppen von Eisenspuren vermieden. Die mit dieser Presse hergestellten Pressäfte blieben bis zum Ausschütteln weissgrau und schmeckten genauso scharf, wie der aus den Pilzen bei Verletzung austretende Milchsaft. Im gleichen Zeitraum waren die mit der aus Gusseisen bestehenden Tinkturenpresse hergestellten Pressäfte dunkel, wenn nicht ganz schwarz geworden. In Benzol hatte ich eine gute Extraktionsflüssigkeit gefunden:

1. Mit Benzol konnte ich bisher die grösste Menge der Scharfstoffe extrahieren;
2. Benzol schwächt beim Ausschütteln die Enzymwirkung oder hebt sie auf;
3. Indem der aus der Tinkturenpresse herausfliessende Pressaft in Benzol aufgefangen wurde, konnte weiterer Zutritt von Luftsauerstoff ausgeschlossen werden.

Trennungsgang mit Hilfe der Säulenchromatographie

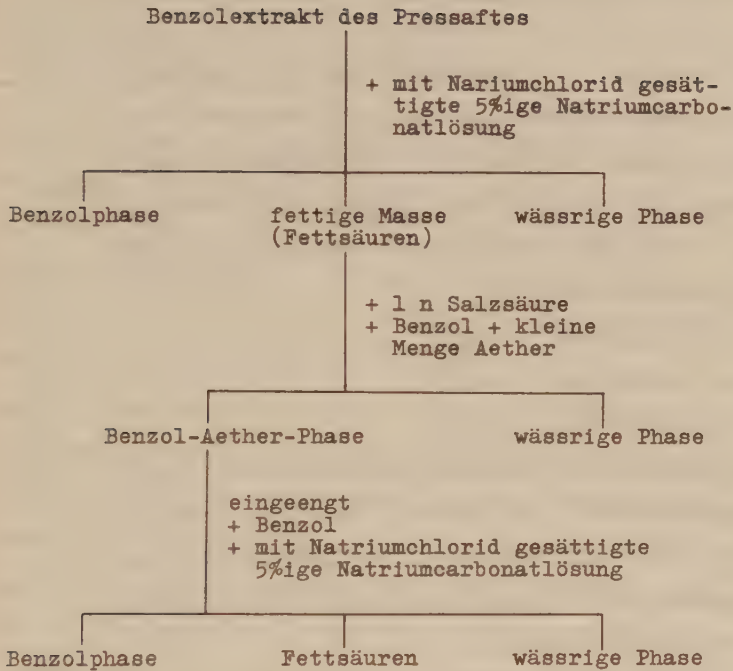
Extraktion des Milchsafte

Auf Grund der Vorversuche wurden in zwei Arbeitsgängen 5540 g und 5240 g frisch gesammelter Pilze aufgearbeitet, indem der mit einer Hafico-Presse hergestellte Presssaft mit Benzol ausgezogen wurde. Die entstehenden Emulsionen wurden mit Hilfe einer Zentrifuge gebrochen und die gesammelten Benzolphasen mit Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Einengen im Vakuum wurde eine gelbe, zum Teil kristallisierende Masse erhalten.

Abtrennung der Fettsäuren

Um eine Isolierung der Scharfstoffe auf einer mit Kieselgel beschickten Säule vornehmen zu können, wurde versucht die Fettsäuren abzutrennen. Zu einem Vorversuch wurde erst eine kleine Menge des Benzol-extraktes eingesetzt und anschliessend der restliche Extrakt genauso behandelt.

Die Abtrennung der Fettsäuren sei nachfolgend in einem Schema erläutert:



Die beiden Benzolphasen wurden vereinigt, eingeeengt und weiterverarbeitet.

Chromatographie des vorgereinigten Benzolextraktes

Auf einer mit Kieselgel gefüllten Säule wurden 30,8 g des Extraktes in drei Arbeitsgängen chromatographiert und die sich entsprechenden Fraktionen nach Kontrolle auf Dünnschichtplatten vereinigt. So wurden folgende drei Fraktionen erhalten, die scharf schmeckten:

1. Scharfstoff 1 rein,
2. Scharfstoff 1 und 2,
3. Scharfstoff 2 rein.

Der Scharfstoff 1 kristallisierte vorerst nicht. Hingegen erhielt ich erstmalig bei der fraktionierten Kristallisation aus Essigsäureäthylester insgesamt 1058 mg farbloser, rhombischer Kristalle des Scharfstoffes 2.



Abb. 1: Kristalle des Scharfstoffes 2 (1:2 vergrößert)

Verbesserter Trennungsgang
mit Hilfe der präparativen
Schichtchromatographie

Einerseits das recht umständliche Verfahren der bisherigen Isolierung der beiden Scharfstoffe, andererseits der Umstand, dass es mir mit dem angewandten Trennungsgang nicht gelungen war den Scharfstoff 1 rein darzustellen, veranlasste mich eine bessere Trennungsmöglichkeit zu suchen.

Auf mit Kieselgel GF₂₅₄ der Fa. Merck beschichteten Platten konnte ich nach dem Entwickeln kleiner Proben des von der Säulenchromatographie übriggebliebenen Scharfstoffgemisches mit dem Laufmittel Cyclohexan-Chloroform-Essigsäureäthylester (60+20+20) unter der UV-Lampe die Flecken beider Scharfstoffe als blauviolette Löschung deutlich erkennen. Diese Flecken wurden unter der UV-Lampe angezeichnet und die Platten anschliessend mit dem bisher zur Identifizierung verwendeten Reagens Antimonpentachlorid in Chloroform besprüht. Die angefärbten Flecken deckten sich voll mit denen, die ich unter der UV-Lampe angezeichnet hatte. Auch eine Geschmacksprobe des herausgekratzten Kieselgels der unter UV-Licht angezeichneten Flecken ergab deren Identität mit meinen früheren Feststellungen.

Diese neue Identifizierungsmöglichkeit der beiden

Scharfstoffe in der Dünnschichtchromatographie veranlasste mich das gleiche mit dem Kieselgel PF₂₅₄, Merck, Darmstadt, in der präparativen Schichtchromatographie zu versuchen.

Die ersten Versuche der präparativen Schichtchromatographie führte ich mit der vom Vorjahr vorhandenen Mutterlauge der fraktionierten Kristallisation des Scharfstoffes 2 und mit dem aus gleicher Aufarbeitung stammenden Gemisch der beiden Scharfstoffe durch. Auf die mit Kieselgel PF₂₅₄ beschichteten und aktivierten Platten wurden obige Lösungen aufgetragen und in einer mit dem gleichen Laufmittel (Cyclohexan-Chloroform-Essigester = 60+20+20) wie bei der Säulen- und Dünnschichtchromatographie beschickten Kammer chromatographiert. Die Trennung wurde unter der UV-Lampe kontrolliert und die Platten 3-5mal, je nach Trennung, chromatographiert.

Brachte ich in die Chromatographiekammer 10 und mehr 20 x 40 cm Platten auf einmal ein, so verlief trotz guter Kammersättigung die Fliessgrenze V-förmig.

Vermeiden konnte ich dies, indem ich auf die Platten nach dem Auftragen des Extraktes je 50 ml des Laufmittels aufsprühte und die Platten bis zum Einbringen in die Kammer aufeinanderlegte. Die dicht nebeneinanderliegenden Zonen der Scharfstoffe konnten nun durch wiederholtes Entwickeln der Platten einigermaßen getrennt werden. Wurde das Laufmittel zwi-

schendurch vollständig abgedunstet, so konnte ich nach kurzem Liegen der Platten an der Luft und erneutem Chromatographieren zwei deutlich braungelbe Banden im Bereich der nach dem ersten Chromatographieren markierten Banden der beiden Scharfstoffe feststellen. Bei Rechromatographie konnte ich dies auch wiederholen. Offensichtlich handelte es sich hierbei um eine Oxydation der Scharfstoffe an der Luft. Die Bildung der Banden und somit der Oxydation konnte ich beim weiteren Arbeiten verhindern, indem ich das Laufmittel von den Platten nicht vollständig verdunsten liess. Auch nach beendeter Chromatographie wurden die Platten nicht vollständig getrocknet, sondern, nachdem der grösste Teil des Laufmittels abgedunstet war und die Platten nicht mehr transparent erschienen, wurden diese aufeinandergelegt. Es bildete sich so zwischen den Platten (vor allem über der Kieselgelschicht) eine mit Laufmitteldampf gesättigte Kammer, womit die Oxydation der beiden Scharfstoffe und somit die Bildung der braungelben Banden ausgeschlossen wurde.

Die Banden der Scharfstoffe wurden nach dem Entwickeln unter der UV-Lampe angezeichnet, das Kieselgel herausgekratzt, mit Essigsäureäthylester eluiert und nach dem Trocknen und Einengen die beiden Scharfstoffe aus Essigsäureäthylester fraktioniert kristallisiert.

Mit dieser Methode konnte ich auch auf das Abtrennen der Fettsäuren, wie es vor der Säulenchromatographie durchgeführt wurde, verzichten. In Vorversuchen stellte ich auf Dünnschichtplatten fest, wie weit grössere, aufgetragene Mengen von Stearinsäure, Palmitinsäure und Oelsäure mit dem Laufmittel Cyclohexan-Chloroform-Essigester (60+20+20) hochschleppen. Die Rf-Werte der zum Vergleich aufgetragenen Scharfstoffe waren grösser, als die Rf-Werte der oberen Fließsgrenze der Fettsäurenbande. Auch beim Auftragen des von den Fettsäuren nicht befreiten Benzolextraktes des Pressaftes auf Dünnschichtplatten, konnte ich nach dem Entwickeln eine gute Abtrennung der beiden Scharfstoffflecke von der hochschleppenden Fettsäurebande feststellen (Abb. 2 a). Selbst bei grösseren aufgetragenen Mengen auf präparativen Schichtchromatogrammen trennten sich die beiden Scharfstoffe bei wiederholter Chromatographie aus der breiten, schleppenden Zone der Fettsäure ab (Abb. 2 b).

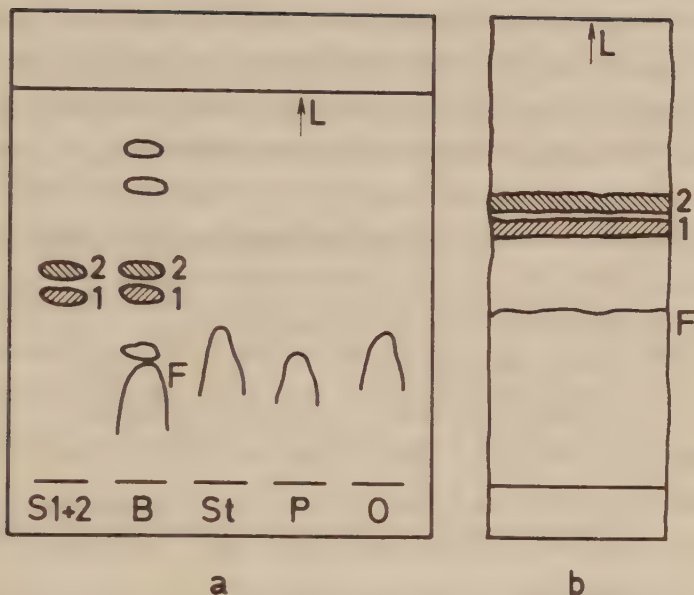


Abb. 2

- a: Dünnschichtchromatographische Kontrolle der oberen Laufgrenze von drei Fettsäuren und der Fettsäuren im Benzolextrakt unter Trennungsbedingungen der beiden Scharfstoffe.
- b: Ausschnitt eines präparativen Schichtchromatogramms des Benzolextraktes (5 x entwickelt).

S1 Scharfstoff 1, S2 Scharfstoff 2, B Benzolextrakt, St Stearinsäure, P Palmitinsäure, O Oelsäure, F obere Grenze der hochschleppenden Fettsäuren, L Laufmittelgrenze.
 Die Chromatogramme wurden unter UV-Licht betrachtet.

Der, wie bei den früheren Aufarbeitungen, aus dem Presssaft der Pilze hergestellte Benzolextrakt wurde weiter nur bis zur beginnenden Kristallisation eingengt und vor dem Auftragen auf die Platten mit dem Laufmittel auf das doppelte Volumen verdünnt.

So wurden auf dem eben geschilderten Weg aus den Mutterlaugen des Vorjahres und dem Benzolauszug der Ernte von 1965 (29 kg) durch Chromatographie auf 107 20 x 40 cm Platten (je 50 g Kieselgel PF₂₅₄)

737 mg Scharfstoff 1 und

1365 mg Scharfstoff 2 kristallin erhalten.

Durch Aufarbeiten der Mutterlauge von 1965 und des Benzolextraktes des Pressaftes der 1966 gesammelten Pilze (34,1 kg) und Chromatographie auf 170 Platten 20 x 40 cm erhielt ich

1272 mg Scharfstoff 1 und

1369 mg Scharfstoff 2 kristallin.

Die Ausbeute schwankt sehr in Abhängigkeit vom Wetter, bei dem die Pilze gesammelt wurden.

Weitere Versuche der Reindarstellung der Scharfstoffe u. 2

Extraktion des eingengten Milchsafte

Beim Einengen des Pressaftes von 931 g frisch gesammelter Pilze, wurde nach dem Trocknen im Exsiccator

ein sehr scharf schmeckender Rückstand erhalten. Die zähe, Agar-Agar ähnliche Masse wurde mit Seesand fein verrieben und im Soxhlet mit Benzol acht Stunden extrahiert. Nach dem Einengen wurde eine fettige Masse erhalten, die jedoch kaum scharf schmeckte.

Wasserdampfdestillation der Pilze

Ungeachtet dessen, dass alle Autoren das schnelle Verschwinden des scharfen Geschmacks der Pilze beim Erhitzen feststellten, wurde eine Wasserdampfdestillation durchgeführt, die jedoch ohne Erfolg verlief.

Natriumbisulfitausschüttelung des Benzolextraktes

Nachdem ich die beiden Scharfstoffe als Dialdehyde erkannt hatte, versuchte ich in zwei Ansätzen die Scharfstoffe als Bisulfitverbindungen aus dem Benzolextrakt zu isolieren. Die Versuche verliefen leider ohne Erfolg.

Gefriertrocknung der Pilze *Lactarius vellereus* und *Lactarius piperatus*

Wenige Pilze jeder Art wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und anschliessend gefriergetrocknet. Der Druckausgleich im Rezipienten wurde mit Stickstoff durchgeführt und die Pilze sofort in Polyäthylenfolien

unter Stickstoff eingeschweisst. Nach dem Gefrier-trocknen schmeckten beide Pilze genauso scharf, wie frische Pilze. Nach 14 Tagen Aufbewahrung musste ich jedoch zu meiner grossen Ueberraschung feststellen, dass der scharfe Geschmack verschwunden war.

Aufgrund dieser Beobachtung sei nachstehend noch folgender Weg der Isolierung der Scharfstoffe zur Diskussion gestellt und zwar umso mehr, als ich auf gleichem Weg, auf dem ich den Benzolextrakt des *Lactarius vellereus* hergestellt hatte, aus *Lactarius piperatus* in einem kleinen Ansatz keinen scharf schmeckenden Benzolextrakt erhalten habe.

Dass die in der Gefriertruhe bei -20° eingefrorenen und wieder aufgetauten Pilze nicht mehr scharf schmeckten, ist dadurch zu erklären, dass das in den Zellen vorhandene Wasser bei dem relativ langsamen Einfrieren bei -20° auskristallisiert und die Zellstrukturen und Zellwände zerstört. Bei erneutem Auftauen kommen sodann die im frischen Pilz getrennt vorliegenden Fermente mit den Scharfstoffen zusammen und oxydieren diese. Die gefriergetrockneten Pilze schmeckten nach der Gefriertrocknung genauso scharf, wie frische Pilze. Durch das schnelle Einfrieren in flüssigem Stickstoff erstarrt das in den Pilzen vorhandene Wasser amorph, zerstört nicht die Zellstruktur und wird durch die Lyophilisation bei tiefen Temperaturen entfernt. Das

nachträgliche Verschwinden des scharfen Geschmacks und die dies verursachende Veränderung der Scharfstoffe ist in einer geringen Restfeuchtigkeit und dem durch die Polyäthylenfolie diffundierenden Luftsauerstoff zu suchen.

V o r s c h l a g e i n e s n e u e n W e g e s d e r I s o l i e r u n g d e r S c h a r f - s t o f f e

Einerseits um erhebliche Verluste zu vermeiden, andererseits um die schwierige Trennung der bei der Ausschüttelung des Pressaftes entstehenden Emulsionen zu umgehen, erscheint es mir zweckmässig die gesammelten Pilze schnell einzufrieren, zu lyophilisieren und sogleich die zerriebenen Trockenpilze mit wasserfreiem Benzol zu extrahieren. Für eine Extraktion der gefriergetrockneten Pilze spricht ein weiterer Grund, und zwar verbleibt trotz sorgfältigem Auspressen der Pilze ein beträchtlicher Teil des Milchsafte in den Pilzen, der durch die Extraktion der gefriergetrockneten Pilze auch erfasst würde. Der Benzol-extrakt kann dann weiter, wie oben beschrieben, durch präparative Schichtchromatographie getrennt werden.

Die Gefriertrocknung, die ich im vergangenen Jahr leider nicht wiederholen konnte, würde so auch die

Möglichkeit einer genauen Gehaltsbestimmung der beiden Scharfstoffe bieten.

Nach meinen überschlägigen Berechnungen enthält der frische *Lactarius vellereus* 0,01 - 0,02% (eventuell sogar noch mehr) des Scharfstoffes 2 und etwas weniger des Scharfstoffes 1, der wesentlich empfindlicher ist.

U N T E R S U C H U N G D E R B E I D E N S C H A R F S T O F F E

Die beiden Scharfstoffe wurden für die nachstehenden Untersuchungen im evakuierten Exsiccator über Calciumchlorid getrocknet. Beim Versuch den Scharfstoff 2 nach dem Kristallisieren aus Essigsäureäthylester in der Trockenpistole (Chloroform, Kaliumhydroxid) zu trocknen, musste ich bereits nach kurzer Zeit ein Gelbwerden der Substanz feststellen.

Den Scharfstoff 2 erhielt ich als ersten kristallin und in einer grösseren Menge - so untersuchte ich primär den Scharfstoff 2 und verglich mit diesem den Scharfstoff 1.

Scharfstoff 2 zeigte einen Schmelzbereich von 104,5-105°. Das Gemisch mit Scharfstoff 1, der einen Schmelzbereich von 87-87,5° hat, ergab den eutektischen Schmelzpunkt von 62°. Eine Sublimation war bei Scharfstoff 2 ab 100° zu beobachten.

Bei der Messung der optischen Drehung, die zunächst in absolutem Aethanol durchgeführt wurde, zeigte Scharfstoff 2 eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = 290,6^\circ$, $291,4^\circ$ für eine 2,73 und 2,44%ige Lösung und eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = 296,2^\circ$, $298,6^\circ$ für eine 0,505 und 0,68%ige Lösung. Wurde eine 2,47%ige Lösung in absolutem Aethanol mit einer Spur Ammoniak versetzt, so zeigte die Lösung eine spezifische Drehung von

$[\alpha]_D^{20} = 383,6^\circ$. In reinem Dioxan stellte ich für eine 0,515%ige Lösung von Scharfstoff 2 eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = 274,9^\circ$ fest.

Bei der Bestimmung der Dichte von Scharfstoff 2 wurde mit Hilfe der Verdrängungsmethode die Dichte $\rho = 1,165$ und mit Hilfe der Schwebemethode die Dichte $\rho = 1,164$ gefunden.

Die versuchten Nachweise von Stickstoff, Schwefel sowie Halogenen verliefen negativ. Scharfstoff 2 enthält Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff.



(M.G. 232)

1. Substanz 3,316 mg: 9,458 mg CO_2 , 2,577 mg H_2O
2. Substanz 4,570 mg: 12,985 mg CO_2 , 3,570 mg H_2O

		% C	% H
Gefunden	1.	77,84	8,70
	2.	77,55	8,74
Berechnet		77,55	8,68

Mit Hilfe eines Dampfdruckkosmometers wurde ein Molekulargewicht von 229,6 und 228,8 ermittelt (in Benzol gemessen). Die Molekulargewichtsbestimmung auf Grund des Molekülions im Massenspektrum ergab die MZ 232.

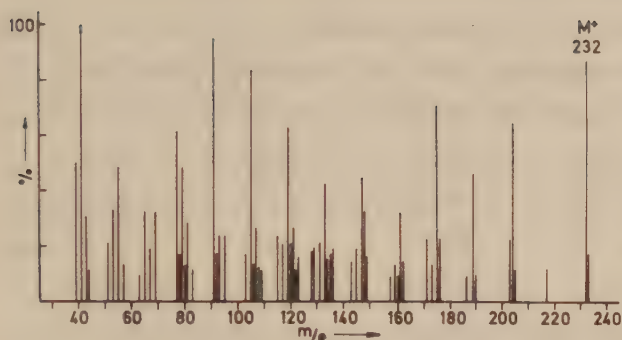


Abb. 3: Massenspektrum von Scharfstoff 2

Scharfstoff 2 in Aceton gelöst entfärbte sehr stark Kaliumpermanganat und färbte sich intensiv gelb in äthanolischer Lösung durch Kaliumhydroxid. Alkalische Silbernitratlösung (n. TOLLENS) wurde stark reduziert. Bromlösung in Chloroform wurde durch den Scharfstoff 2 sofort entfärbt - nach wenigen Sekunden wurde die Lösung jedoch rot. Die Färbung nahm deutlich an Intensität zu und steigerte sich zu einem dunklen Weinrot. Beim weiteren Zufügen von Bromlösung färbte sich die Lösung dunkelbraun und beim Verdunsten des Lösungsmittels der weinroten Lösung hinterblieb eine genauso gefärbte Substanz.

Das auf Grund der reduzierenden Eigenschaften hergestellte (58) und aus Benzol-Ligroin kristallisierte 2,4-Dinitrophenylhydrazon von Scharfstoff 2 gab einen

Schmelzbereich von 175-176°.

$C_{27}H_{28}N_8O_8$ (M.G. 592,58)

Substanz 2,995 mg: 5,957 mg CO_2 , 1,310 mg H_2O

Substanz 1,430 mg: 230 ml N_2 , 745 Torr, 30,00°C

	% C	% H	% N
Gefunden	54,28	4,89	17,76
Berechnet 1.	54,72	4,77	16,55
2.	61,14	5,87	13,60

Die 1. Berechnung berücksichtigt die Anlagerung von zwei 2,4-Dinitrophenylhydrazinmolekeln, die 2. Berechnung berücksichtigt die Anlagerung von nur einem Molekül des 2,4-Dinitrophenylhydrazins. Das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Scharfstoffes 2 ergab somit die obige Summenformel und stellt ein Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon dar. Hiermit und durch das später zu diskutierende IR- und KMR-Spektrum waren die beiden Sauerstoffe in funktionellen Gruppen und zwar als Aldehydgruppen festgestellt.

Beim Versuch von Scharfstoff 2 das p-Brom-phenylhydrazon herzustellen, konnte ich eine ähnliche Färbung beobachten, wie beim Versetzen mit Bromlösung. Nach Vorversuchen mit Zimtaldehyd und Vanillin, die aus Eisessig oder Aethanol als p-Bromphenylhydrazone gefällt wurden, wurde unter gleichen Bedingungen der Scharfstoff 2 mit geringem Ueberschuss einer möglichst konzentrierten Lösung des p-Bromphenylhydrazins ver-

setzt. Die Lösung färbte sich zunächst deutlich gelb, wurde dann zusehends dunkler (gelbbraun) und färbte sich schliesslich braunweinrot. Die Bildung der Rotfärbung verläuft in Eisessig wesentlich schneller als in Aethanol. Ein Kristallinat des angestrebten p-Bromphenylhydrazons konnte aus keiner der Proben erhalten werden.

Die Reduktion (59, 60) des Scharfstoffes 2 (Dialdehyd) mit Natriumborhydrid lieferte den entsprechenden Dialkohol.

$C_{15}H_{24}O_2$ (M.G. 236)

Substanz 3,062 mg: 8,578 mg CO_2 , 2,788 mg H_2O

	% C	% H
Gefunden	76,45	10,19
Berechnet	76,33	10,25

Die Spitze des Molekülions M^+ 236 im Massenspektrum bestätigt die Summenformel (Abb. 4).

Bei der Schmelzpunktbestimmung des Diols konnte ein vollständiges Schmelzen bei 111-112° und sofortiges Neukristallisieren beobachtet werden. Beim weiteren Erwärmen schmolz die Substanz sodann bei 116,5-117,5°. Nach dem Abkühlen konnten die gleichen Schmelzpunkte reproduziert werden. Die Schmelzpunktbestimmung wurde im zugeschmolzenen Röhrchen durchgeführt. Die Substanz war aus Benzol kristallisiert. Eine aus Essigsäureäthylester kristallisierte Probe gab den Schmelzpunkt von 118°. Die spezifische Drehung war von ursprüng-

lich $[\alpha]_D^{20} = 274,9^\circ$ beim Dialdehyd auf $[\alpha]_D^{20} = 3,06^\circ$ bzw. $3,1^\circ$ für eine 2,45 bzw. 1,90%ige Lösung des Scharfstoff 2-Diols in absolutem Aethylalkohol gesunken.

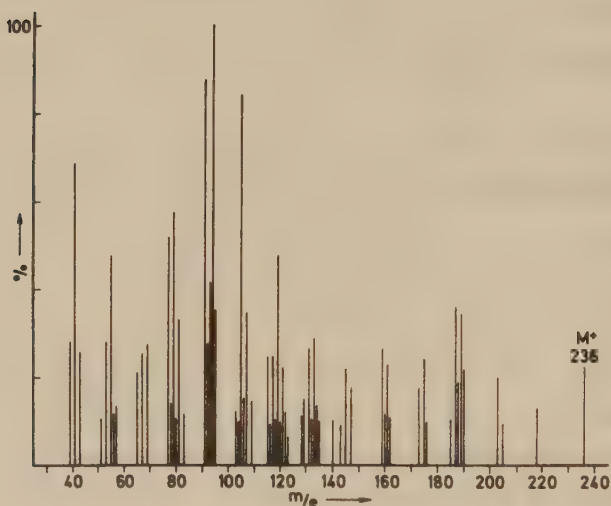


Abb. 4: Massenspektrum des Scharfstoff 2-Diols

Die Hydrierung des Scharfstoffes 2 nach vorheriger Reduktion mit Natriumborhydrid wurde in absolutem Aethanol mit Platinkatalysator durchgeführt. Da sie sehr schleppend verlief, wurde auf die Messung des aufgenommenen Wasserstoffes verzichtet und die Wasserstoffaufnahme aus der Spitze des Molekülions im Massenspektrum festgestellt. Gegenüber dem eingesetzten Diol, das eine Massenzahl des Molekülions von 236 ergab, konnte bei dem Hydrierungsprodukt die

Zunahme von zwei Masseneinheiten festgestellt werden. Das Molekülion zeigt eine Massenzahl von 238, woraus sich die Summenformel $C_{15}H_{26}O_2$ ergab, die in dem Scharfstoff 2 nur eine Doppelbindung zulässt.

Beide Substanzen gaben nach Reinigung und Trennung im Massenspektrum ein Molekülion mit der Massenzahl 238.

Da das Hydrierungsprodukt flüssig und schwach gelblich war, versuchte ich es chromatographisch zu reinigen, wobei sich auf DC-Platten mit dem Laufmittel Cyclohexan-Essigester (20 + 80) zwei Flecken zeigten mit den Rf-Werten 0,43 und 0,53, die sich auch mit Antimonpentachlorid in Chloroform anfärben liessen. Auf präparativen Schichtchromatographie-Platten wurde das Hydrierungsprodukt getrennt. Nach dem Einengen kristallisierte die Substanz mit dem Rf-Wert 0,53 und gab einen Schmelzpunkt von 113° .

Die andere Substanz blieb zähflüssig. Beim Versuch das Hydrierungsprodukt mit dem Rf-Wert 0,53 im Öelpumpenvakuum bei 100° zu sublimieren wurde diese genauso zähflüssig und kristallisierte nicht mehr. Offensichtlich neigte der hydrierte Alkohol zur Isomerisierung, die ich auch anderenorts beobachten konnte.

Beim Versuch an die Doppelbindung des Scharfstoff 2-Diols Bromwasserstoff anzulagern, und gleichzeitig

die OH-Gruppe gegen Bromatome auszutauschen, musste ich selbst bei -10° feststellen, dass die Lösung völlig schwarz wurde.

So versuchte ich den Austausch der OH-Gruppen gegen Bromatome an dem hydrierten Scharfstoff 2-Diol. Zu der auf -20° gekühlten Lösung des hydrierten Diols in Chloroform leitete ich eine etwa äquivalente Menge Bromwasserstoff ein, wobei die Lösung nur schwach gelb wurde. Nach dem Aufarbeiten und der chromatographischen Reinigung wurde eine geringe Menge einer zähen Flüssigkeit erhalten, die nach dem Massenspektrum der Substanz mit der Summenformel $C_{15}H_{24}Br_2$ entsprach.

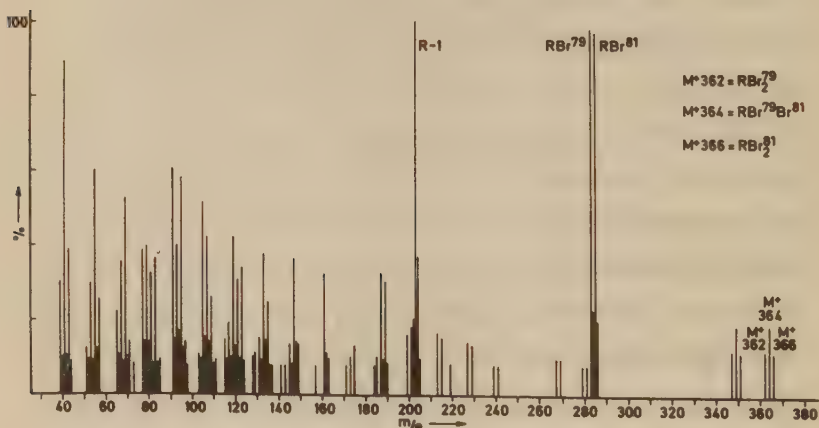


Abb. 5: Massenspektrum des Dihydro-dibrom-bis-desoxy-Scharfstoffes 2

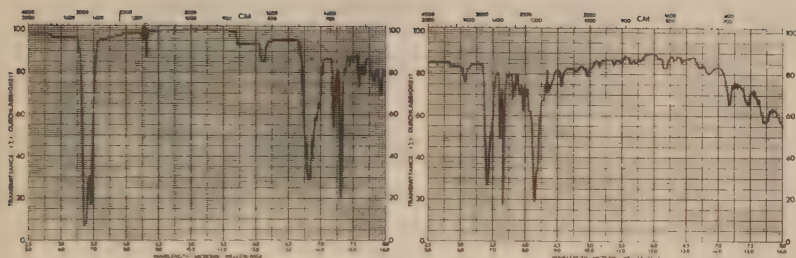


Abb. 6: IR-Spektrum des Dihydro-dibrom-bis-desoxy-Scharfstoffes 2

Die Oxydation von Scharfstoff 2 wurde in mehreren Ansätzen (56) versucht und die Kontrolle mit IR-Spektren durchgeführt.

1. Scharfstoff 2 wurde mit gewaschenem Silberoxid in 80%igem Aethanol bei 0°C 7,5 Stunden oxydiert. Hierbei konnte praktisch keine Veränderung des Scharfstoffes festgestellt werden.
2. Scharfstoff 2 wurde mit gewaschenem Silberoxid in 80%igem Aethanol bei 55° oxydiert.
3. Scharfstoff 2 wurde mit Silberoxid unter Zusatz der äquivalenten Menge Natriumhydroxid in 80%igem Aethanol 2 Stunden bei Zimmertemperatur oxydiert.
4. Scharfstoff 2 wurde mit Silberoxid in Pyridin während 9 Stunden bei Zimmertemperatur oxydiert.

Nach dem Aufarbeiten gaben die Versuche 2-4 trotz Wiederholung immer harzige Rückstände. Zu bemerken ist, dass diese Versuche mit Mengen von 10-50 mg durchgeführt wurden.

Unter den von MAYO (57) angegebenen Bedingungen versuchte ich nochmals mit einer grösseren Menge die Oxydation von Scharfstoff 2 mit Silberoxid in wässrigem Aethanol. Beim Aufarbeiten konnte der grösste Teil aus der alkalischen Lösung mit Aether wieder ausgeschüttelt werden. Ein Oxydationsprodukt, d.h. die gewünschte Säure, erhielt ich auch bei dieser versuchten Oxydation nicht. Der in der alkalischen Lösung verbliebene Anteil ergab einen geringen harzigen Rückstand, der nicht weiter gereinigt werden konnte.

Scharfstoff 1 zeigte einen Schmelzbereich von 87-87,5°.

Bei der Messung der optischen Drehung, die in absolutem Aethanol erfolgte, wurden Werte erhalten ($[\alpha]_D^{20} = 11,5^\circ, 5,44^\circ, 7,75^\circ, 12,1^\circ$ und nach 20 Minuten $17,7^\circ$), die trotz sorgfältigstem Arbeiten grosse Differenzen aufwiesen. Aus der Tabelle 1 (Seite 57) ist die Abhängigkeit der spezifischen Drehung einer 2,45%igen Lösung in absolutem Aethanol von dem Zeitpunkt der Messung nach dem Auflösen des Scharfstoffes 1, das am 1. Tag um 12.30 Uhr erfolgte, zu ersehen.

Zeitpunkt der Messung Tag	Uhrzeit	$[\alpha]_D^{20}$	Zeitpunkt der Messung Tag	Uhrzeit	$[\alpha]_D^{20}$
1.	14.00	20,8	3.	24.00	156,3
	17.00	32,6		11.10	174,2
	20.00	40,8		11.00	207,3
2.	2.30	52,2	4.	20.30	212,2
	10.30	71,4		23.30	214,6
	12.45	78,7		9.30	220,4
	14.30	82,0	5.	18.15	235,0
	18.30	93,8		10.15	238,3
	21.00	98,7	6.	17.30	244,4
	24.00	107,3		20.	248,9
3.	9.30	127,7	22.		248,9

Tab. 1: Aenderung der spezifischen Drehung einer 2,45%igen Lösung des Scharfstoffes 1 in absolutem Aethanol in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung nach dem Auflösen der Substanz

Je früher nach vollständiger Lösung des Scharfstoffes 1 in Aethanol die Messung erfolgte, desto kleiner war die optische Drehung. Somit liegt nahe, dass der Scharfstoff 1 optisch inaktiv ist und sich erst in Lösung zu einer optisch aktiven Substanz umlagert. Wurde eine andere Probe der gleichen Lösung (2,45%ig) mit der die Messung über den grösseren Zeitraum erfolgte mit einer Spur Ammoniak versetzt, so zeigte die Lösung nach 5 Minuten eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = 313,4^\circ$ und nach 3 Stunden erreichte sie den Wert von $337,7^\circ$, der sich bei weiteren Nachmessungen nicht mehr änderte.

Eine dritte Probe derselben Lösung wurde 5 Tage in

Kühlschrank (ca. -5°) aufbewahrt und zeigte danach eine spezifische Drehung von $[\alpha]_D^{20} = 100,4^{\circ}$.

In reinem Dioxan zeigt Scharfstoff 1 keine optische Drehung.

Die Dichte von Scharfstoff 1 wurde nicht bestimmt, da bei der fraktionierten Kristallisation nur sehr kleine Kristalle erhalten wurden, so dass mit den bei Scharfstoff 2 angewendeten Methode eine genaue Bestimmung nicht möglich war.

Die versuchten Nachweise von Stickstoff, Schwefel sowie Halogenen verliefen negativ. Scharfstoff 1 enthält, genau wie Scharfstoff 2, Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff.

$C_{15}H_{20}O_2$ (M.G. 232)

Substanz 4,489 mg: 12,765 mg CO_2 ; 3,460 mg H_2O

	% C	% H
Gefunden	77,59	8,63
Berechnet	77,55	8,68

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte auf Grund des Molekülions im Massenspektrum: M^+ 232 (Abb. 7).

Die Art der Bindung der Sauerstoffatome und somit die funktionellen Gruppen von Scharfstoff 1 wurden aus den später zu besprechenden IR- und KMR-Spektren festgestellt, sowie aus der Reduktion mit Natriumborhydrid und der anschließenden massenspektroskopischen Molekulargewichtsbestimmung.

Der Scharfstoff 1 stellt genauso wie Scharfstoff 2 einen Dialdehyd dar.

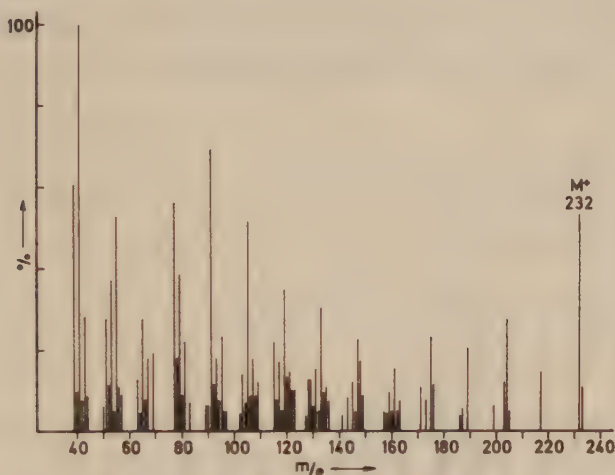


Abb. 7: Massenspektrum von Scharfstoff 1

Der Scharfstoff 1 wurde unter gleichen Bedingungen wie Scharfstoff 2 zum Dialkohol mit Natriumborhydrid reduziert. Das Diol des Scharfstoffes 1 stellt eine zähe Flüssigkeit dar, die nicht kristallisierte. Auch eine Reinigung auf Kieselgel PF_{254} -Platten (20 x 40 cm) mit dem System Cyclohexan-Essigsäureäthylester (20+80) führte nicht zur Kristallisation des Diols.

Das Molekülion im Massenspektrum des Scharfstoff 1-Diols zeigte die Zunahme von vier Masseneinheiten gegenüber dem Dialdehyd, der die Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_2$ hat, und

ergibt somit für den Scharfstoff 1-Diol die Summenformel $C_{15}H_{24}O_2$.

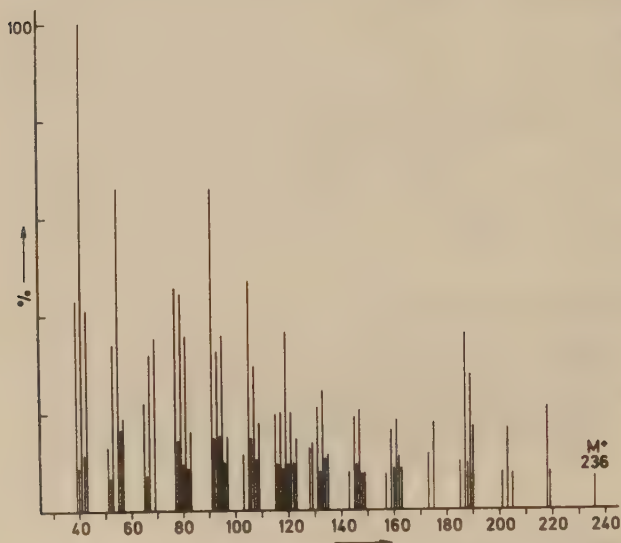


Abb. 8: Massenspektrum des Scharfstoff 1-Diols

Das Scharfstoff 1-Diol wurde in Eisessig mit Platin als Katalysator hydriert. Da die Aufnahme des Wasserstoffes noch langsamer verlief, als beim Scharfstoff 2-Diol, wurde diese mit Hilfe der Massenspektroskopie, die die Zunahme von 2 Masseneinheiten im Molekülion (M^+ 238) zeigte, bestimmt. Aus der Hydrierung kann somit in Scharfstoff 1 nur eine Doppelbindung angenommen werden.

Bei den vorliegenden Scharfstoffen 1 und 2 handelt es sich auf Grund der Summenformel und ihrer Eigenschaften¹ offensichtlich um Sesquiterpene, die beide zwei Aldehydgruppen haben. Um zu beweisen oder auszuschliessen, dass ein hydroaromatisches System vorliegt, führte ich Dehydrierungen durch.

Nachdem in Vorversuchen verschiedene aromatische Systeme als Dehydrierungsprodukte von Hydroaromaten erhalten wurden, versuchte ich die Diole der Scharfstoffe 1 und 2 unter gleichen Bedingungen zu dehydrieren. Die Dehydrierung wurde in evakuierten Mikrobomben mit 10%iger Palladium-Kohle im Bombenofen bei 310° während 20 Stunden und im Metallbad während 5 Stunden bei gleicher Temperatur durchgeführt. Obwohl die Vorversuche eine glatte Aromatisierung der Testsubstanzen (Limonen, Tetralin, Decalin, Guajol) ergaben, konnte von dem eingesetzten Scharfstoff 1 und 2 nach der Isolierung nur farblose Kohlenwasserstoffe erhalten werden, die weder im UV- noch im IR-Spektrum ein aromatisches System zeigten. Um auszuschliessen, dass geringe Mengen von Aromaten beim Aufarbeiten der Dehydrierungsprodukte der beiden Scharfstoffe nicht erfasst werden, wurde eine Dehydrierungsmethode im Injektor eines Autoprep-Gaschromatographen ausgearbeitet. Mit einer ähnlichen Anordnung arbeitete auch J.C.NIGAM (61).

Der innen vergrösserte, aus Edelstahl bestehende, Injektor (Abb. 9) wurde mit 50%igem Palladiumasbest be-

ziehungsweise mit 0,5%igem Palladium/ α -Aluminiumoxid ¹ der Korngrösse 0,1-0,5 mm so gefüllt, dass vor der Füllung eine kleine Verdampfungskammer freiblieb. Als Trägergas diente Helium, das bei allen Versuchen mit der Geschwindigkeit von 200 ml in der Minute strömte. Zur Trennung diente eine mit 30% Se 30 auf Chromosorb W gefüllte Aluminium-Säule, die 6 m lang war und einen Querschnitt von 6 mm hatte.

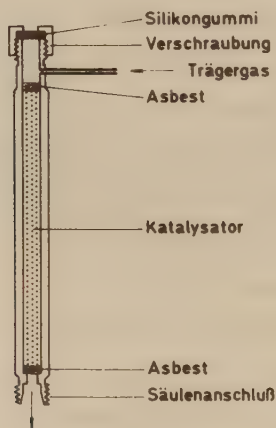


Abb. 9: Umgebauter Injektor des Autoprep A 700 Gaschromatographen (im Massstab 1:2 abgebildet)

Mit dieser Methode konnte Tetralin quantitativ und reines cis- und reines trans-Decalin zum grössten Teil zu Naphthalin dehydriert und analysiert werden.

¹ Hersteller Fa. W.C. Heraeus GmbH., Hanau

Wie aus dem nachstehenden Gaschromatogramm (Abb. 10) zu ersehen ist, gab Guajol bei der Dehydrierung Guajazulen, Naphthalin, Guajen und eine polymerisierende Substanz. Das gleichzeitig gebildete Diphenyl entstand aus Benzol, das zur Lösung des Guajols verwendet wurde.

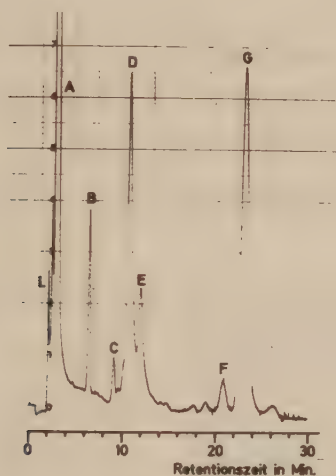


Abb. 10

Gaschromatogramm der Guajoldehydrierungsprodukte:
L Luftspitze, A Lösungsmittel (Benzol),
B Naphthalin (Schmp., Mischschmp., Vergl. d. Retentionszeit im GC), C Diphenyl (entstand auch beim Einspritzen von reinem Benzol, Schmp., Mischschmp., UV-Sp.), D Guajen (IR-Sp., MZ d. Molekülions im Massensp.), E unbekannte Substanz (polymerisierte relativ schnell), F unbekanntes Azulen, G Guajazulen (Farbe, UV-, IR-Sp., MZ d. Molekülions im Massensp.).

Injektor mit ca. 2 g 0,1%igem Palladium/ α -Aluminiumoxid gefüllt - Temp. 320°, Aluminiumsäule 6 m, Durchmesser 6 mm, mit 30% Se 30 auf Chromosorb W gefüllt - Temp. 270°, Leitfähigkeitsdetektor - Temp. 300°, Helium 200 ml/Min.

Scharfstoff 1 und 2 bildeten unter den gleichen Dehydrierungsbedingungen weder Naphthalin noch Azulen und auch nicht deren Homologe.

DISKUSION DER SPEKTREN DER BEIDEN SCHARFSTOFFE

Das UV-Spektrum des Scharfstoffes 2 zeigt ein nicht sehr ausgeprägtes Maximum bei 250 m μ ($\epsilon = 7080$), das auf eine Konjugation einer Doppelbindung mit einer Carbonylgruppe deutet.

Die Infrarotabsorption des Scharfstoffes 2 (Abb. 11) zeigt zwei Carbonylbanden bei 1710 und 1680 cm $^{-1}$ und bei 2770 cm $^{-1}$ die charakteristische Aldehyd-C-H-Schwingung, was in Einklang steht mit dem chemischen Nachweis von zwei Aldehydgruppen.

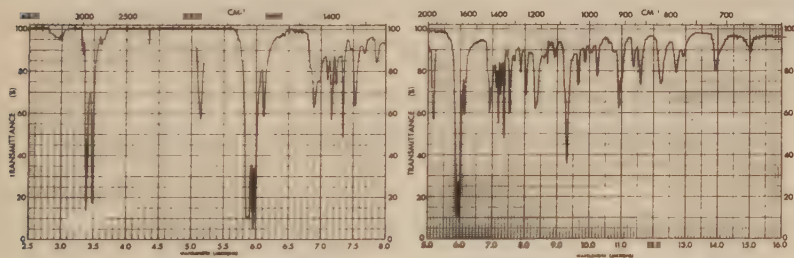


Abb. 11: Infrarotspektrum des Scharfstoffes 2

Das KMR-Spektrum des Scharfstoffes 2 (Abb. 12) zeigt ein Singulett bei $\delta = 9,92$, das äquivalent ist einem Proton und ein zweites Singulett bei $\delta = 9,68$, das gleichfalls einem Proton entspricht.

Somit steht die eine Aldehydgruppe in Konjugation zu einer Doppelbindung und beide α -C-Atome zu den Aldehyd-

gruppen tragen kein Proton. Da durch die Hydrierung nur eine Doppelbindung nachgewiesen wurde, muss das Proton, das im KMR-Spektrum ein Singulett bei $\delta = 6,66$ zeigt, an derselben C-C-Doppelbindung sitzen, wie die Aldehydgruppe. Weiter gibt dieses Proton nach der Reduktion des Dialdehyds zum Diol im KMR-Spektrum ein Singulett bei $\delta = 5,27$, das gegenüber dem Dialdehyd bei höherem Feld liegt. Das α -Kohlenstoffatom zu dem Kohlenstoffatom der C-C-Doppelbindung, an der das Proton $\delta = 6,66$ bzw. $5,27$ sitzt, darf kein Proton tragen, da das Proton der C-C-Doppelbindung ein Singulett gibt.

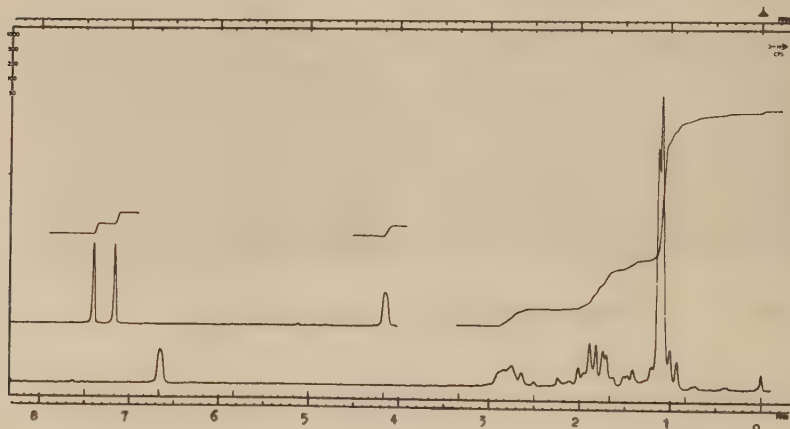
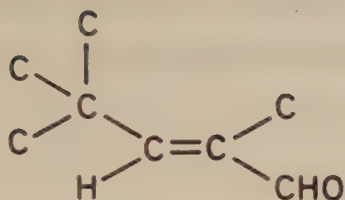
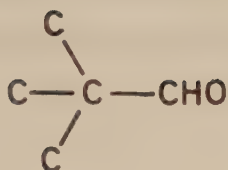


Abb. 12: KMR-Spektrum des Scharfstoffes 2

Dies erlaubt die funktionellen Gruppen folgendermassen festzulegen:



IR: 1680 cm^{-1}



IR: 1710 cm^{-1}

Als Substituenten an der C-C-Doppelbindung können Methylgruppen ausgeschlossen werden, da keine Bande vorhanden ist, die nach der chemischen Verschiebung der Bindung einer Methylgruppe an eine C-C-Doppelbindung entsprechen würde.

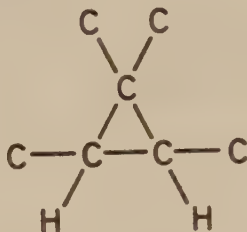
Bei Scharfstoff 2 ergibt sich aus der Ungesättigtheitszahl bei Berücksichtigung der beiden Aldehydgruppen und der einen C-C-Doppelbindung die Anwesenheit von 3 Ringen.

Das KMR-Spektrum des Scharfstoff 2-Dialkohols (Abb. 13) zeigt ein Dublett $\delta = 0,58$ (J 4 Hz) und ein zweites Dublett $\delta = 0,87$ (J 4 Hz), das je einem Proton entspricht.

Im KMR-Spektrum des entstehenden Dialdehyds ist ein Dublett $\delta = 0,96$ (J 4,5 Hz) und ein zweites Dublett $\delta = 1,17$ (J ~ 4,5 Hz) zu finden.

Die charakteristische Lage der Banden weist auf einen Cyclopropanring hin und die deutliche Verschiebung dieser Banden beim Dialkohol gegenüber dem Dialdehyd

zu höherem Feld, lässt die Annahme zu, dass die eine Aldehydgruppe am Cyclopropanring oder in dessen Nähe sitzt.



Das KMR-Spektrum des Scharfstoffes 2 weist beim Dialdehyd ein Singulett $\delta = 1,09$ auf, das 6 Protonen äquivalent ist und ein weiteres Singulett $\delta = 1,13$ das 3 Protonen äquivalent ist. Besser sind diese Banden als Singulets im Spektrum des Diols zu erkennen, wo sie die chemische Verschiebung $\delta = 1,02$ für 6 Protonen und $\delta = 1,28$ für 3 Protonen zeigen.

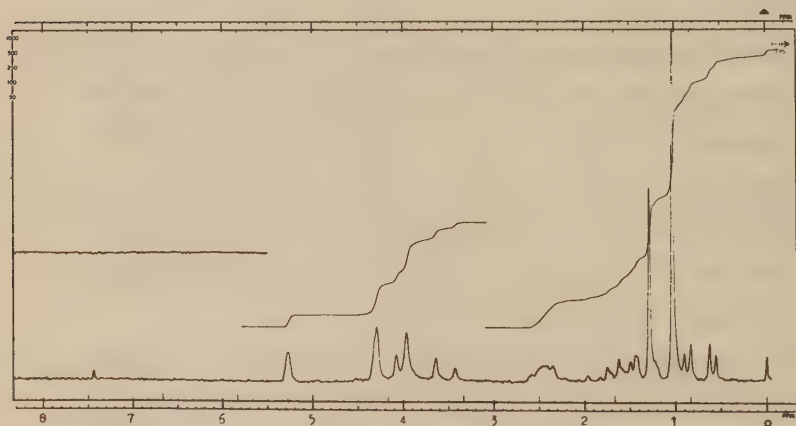
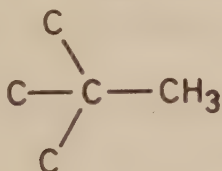


Abb. 13: KMR-Spektrum des Scharfstoff 2-Dialkohols

Somit liegen 3 Methylgruppen vor, von denen zwei die gleiche chemische Verschiebung aufweisen und die dritte eine Bande bei etwas tieferem Feld zeigt.

Keine der Methylgruppen-Banden zeigt jedoch eine Verschiebung, die für eine Bindung an eine C-C-Doppelbindung charakteristisch wäre. Die Bande $\delta = 1,13$ liesse die β -Stellung zur Aldehydgruppe $\delta = 9,68$ zu, bzw. weist sie auf die grundsätzliche Annahme der Abschirmung der einen Methylgruppe durch die Carbonylgruppe hin.

Da alle drei Methylgruppen als Singulett erscheinen, dürfen die α -Kohlenstoffatome keine Protonen tragen.



Das UV-Spektrum des Scharfstoffes 1 zeigt eine sehr schwache Absorption bei 215 m μ , die auf isolierte C-C-Doppelbindung hinweist. Das Maximum bei 250 m μ , das bei Scharfstoff 2 vorhanden ist, ist bei Scharfstoff 1 nicht zu erkennen. Die Infrarotabsorption von Scharfstoff 1 (Abb. 14) zeigt, genau wie Scharfstoff 2, zwei Carbonylbanden bei 1710 und 1675 cm⁻¹ und bei 2730 cm⁻¹

die charakteristische Aldehyd-CH-Schwingung.

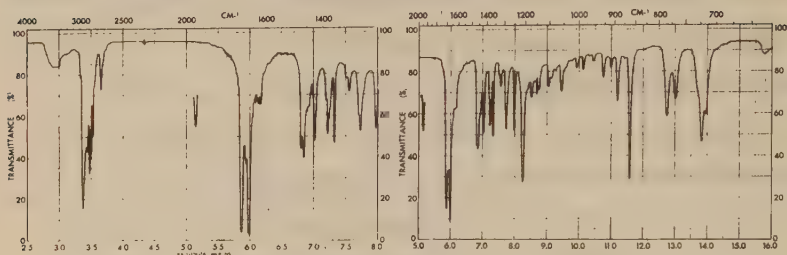


Abb. 14: Infrarotspektrum des Scharfstoffes 1

Das KMR-Spektrum des Scharfstoffes 2 (Abb. 15) bestätigt gleichfalls die beiden Aldehydgruppen mit der charakteristischen Verschiebung von $\delta = 9,56$. Das vorliegende Singulett entspricht zwei Protonen.

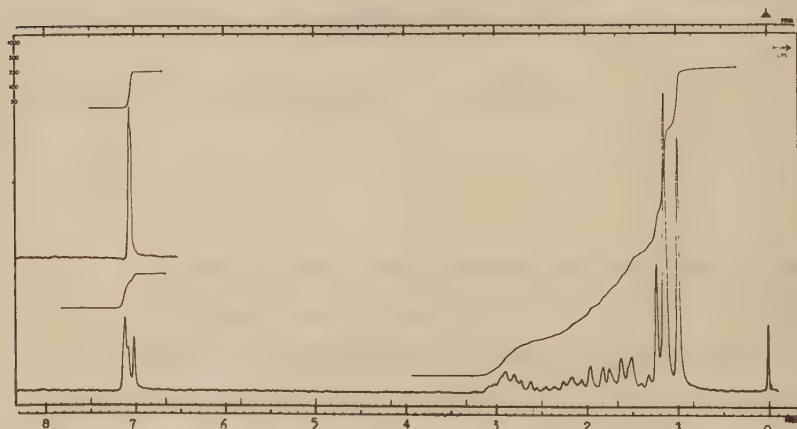
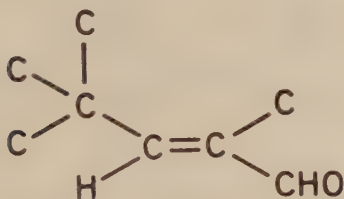
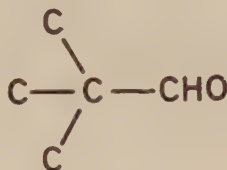


Abb. 15: KMR-Spektrum des Scharfstoffes 1

Auf Grund der Lage der Carbonylbanden im IR-Spektrum muss gefolgert werden, dass die eine Aldehydgruppe in Konjugation zu einer C-C-Doppelbindung steht. Das Singulett $\delta = 9,56$ erlaubt weiter die Aussage, dass die α -Kohlenstoffatome zu den Aldehydgruppen kein Proton tragen. Die Bindungsart der beiden Aldehydgruppen kann somit folgendermassen festgelegt werden:



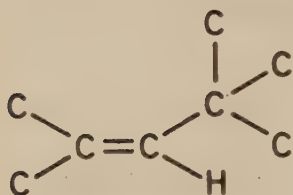
IR: 1675 cm^{-1}



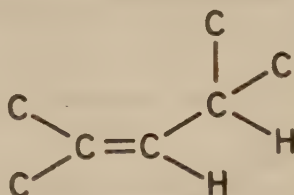
IR: 1710 cm^{-1}

Obwohl die Hydrierung von Scharfstoff 1-Diol, die im Massenspektrum nur die Zunahme von zwei Protonen zeigt, somit nur eine Doppelbindung ermöglicht, weist das KMR-Spektrum von Scharfstoff 1, Aldehyd und Alkohol, zwei Protonen an zwei verschiedenen Doppelbindungen auf. Ein Singulett mit $\delta = 7,06$ und ein Dublett mit $\delta = 7,12$ (J 4 Hz) entsprechen je einem Proton. Da das eine Proton ein Singulett und das andere ein Dublett gibt, können beide Protonen nicht an der selben Doppelbindung sitzen, da sie da zusammen koppeln und je ein beziehungsweise ein gemeinsames Dublett zeigen müssten. Da insgesamt

nur zwei Protonen die chemische Verschiebung aufweisen, die charakteristisch ist für die Bindung an eine C-C-Doppelbindung, kann an jeder nur ein Proton sitzen. Somit können folgende Struktureinheiten angenommen werden:



KMR: $\delta = 7,12$



KMR: $\delta = 7,06$ (J 4 Hz)

Weiter kann ausgesagt werden, dass an keiner der beiden C-C-Doppelbindungen eine Methylgruppe sitzt, da keine der Methylgruppen die hierfür charakteristische Verschiebung aufweist.

Beim Scharfstoff 1-Dialdehyd entspricht ein Singulett $\delta = 0,99$ und ein zweites Singulett $\delta = 1,14$ je drei Protonen. Ein Dublett $\delta = 1,19$ (J ~ 5 Hz) entspricht gleichfalls drei Protonen.

Das KMR-Spektrum des entsprechenden Dialkohols (Abb. 16) weist je ein Singulett das drei Protonen entspricht bei $\delta = 0,93$ und $1,07$ auf. Das drei Protonen äquivalente Dublett zeigt ein $\delta = 0,99$ (J ~ 7 Hz).

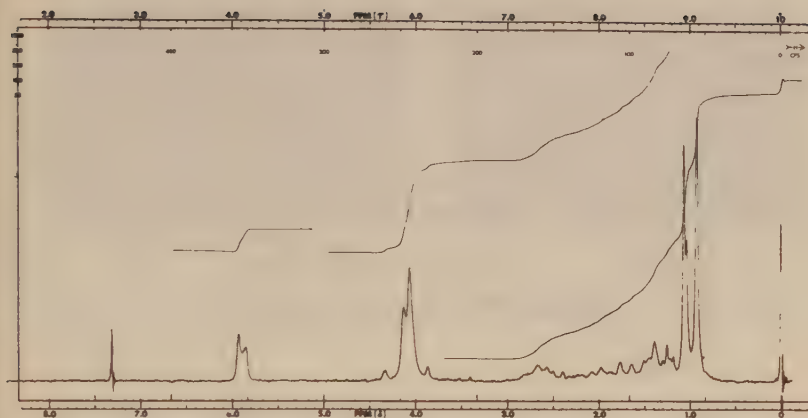
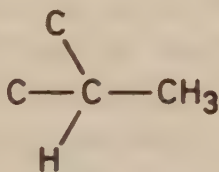
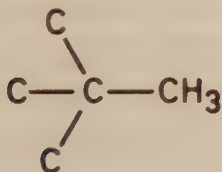


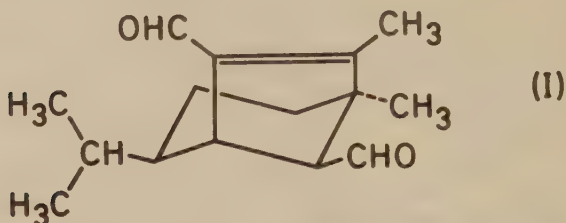
Abb. 16: KMR-Spektrum des Scharfstoff 1-Dialkohols

Von den vorliegenden drei Methylgruppen haben zwei am α -Kohlenstoff kein Proton. Das Dublett weist bei der dritten Methylgruppe auf ein Proton am α -Kohlenstoffatom hin:



Ein weiteres Strukturelement beider Scharfstoffe konnte auf Grund folgender Zusammenhänge sichergestellt werden, die sich aus der beabsichtigten Oxydation des des Scharfstoffes 2 (s. S. 56) ergaben.

MAYO (57) stellte bei der Oxydation von Helminthosporal (I) mit Silberoxid fest, dass nur eine von zwei Aldehydgruppen oxydiert wurde. Der Oxydation unter den angegebenen Bedingungen unterlag die Aldehydgruppe,



die nicht mit einer Doppelbindung konjugiert war. Die zweite, die eine Konjugation mit einer C-C-Doppelbindung aufwies, blieb erhalten.

Nachdem ich von meinen Scharfstoffen wusste, dass genauso wie beim Helminthosporal eine Aldehydgruppe in Konjugation zu einer C-C-Doppelbindung steht und die andere keine Konjugation aufweist (s.S. 65 und 71), versuchte ich analog zu MAYO (57) den Scharfstoff 2 zu oxydieren. Das dabei aus der alkalischen Lösung mit Aether ausgeschüttelte Stoffgemisch gab nach der chromatographischen Reinigung (s.u.) im wesentlichen eine Substanz, die im Massenspektrum ein Molekölion der MZ 306 zeigte. Rechnerisch kann hieraus ausgesagt werden, dass sich an dem Scharfstoff 2 (M.G. 232) unter Austritt von einem Molekül Wasser zwei Moleküle Aethanol angelagert haben müssen.

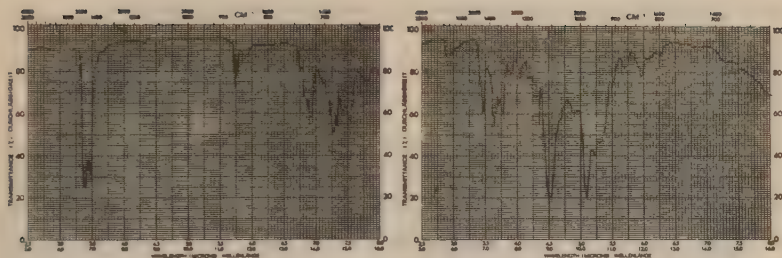
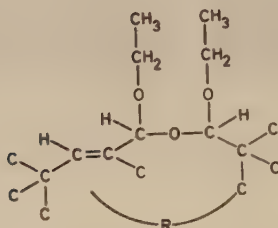


Abb. 17: Infrarotspektrum des Scharfstoff 2-bis-äthyl-acetals

Wie das IR-Spektrum dieser Substanz (Abb. 17) zeigt, sind gegenüber dem IR-Spektrum des Scharfstoff 2-Dialdehyds (Abb. 11, S. 65) die beiden Carbonylbanden bei 1710 und 1680 cm^{-1} und die Bande bei 2770 cm^{-1} fast vollständig verschwunden und zwei neue Banden bei 980 und 1115 cm^{-1} vorhanden, die für die C-O-C-Valenzschwingung von Aethern charakteristisch sind. Weiter ist in dem IR-Spektrum keine OH-Bande vorhanden, die für ein Halbacetal charakteristisch wäre. Somit muss gefolgert werden, dass durch Wasseraustritt bei dem Scharfstoff 2-bis-äthylhalbacetal eine weitere Aetherbrücke, und zwar zwischen den Kohlenstoffatomen der ursprünglichen Aldehydgruppen, gebildet wurde. Dies bestätigt auch das KMR-Spektrum, in dem die bei Scharfstoff 2-Dialdehyd vorhandenen Signale $\delta = 9,92$ und $\delta = 9,68$ nicht mehr vorhanden sind, im Bereich $\delta = 1,0 - 1,4$ ein unübersichtliches Multiplett vorliegt und ein weiteres neues

Multiplett mit dem Schwerpunkt bei $\delta = 3,66$ vorhanden ist, das den am α -Kohlenstoffatom der Äthylgruppen (α -Kohlenstoff zum Sauerstoff) sitzenden Protonen zuzuschreiben ist. Somit ergibt sich folgende Gruppierung:



Beim chromatographischen Vergleich dieses Scharfstoff 2-bis-äthylacetals mit den aus Scharfstoff 1 während längerem Stehen (7 Tage) in absolutem Äthanol (s. auch S. 79) gebildeten Stoffen, zeigte der eine Stoff im System Cyclohexan-Chloroform-Essigsäureäthylester (60+20+20) auf Kieselgel GF₂₅₄-Platten mit 2,4-Dinitrophenylhydrazinreagens (62) besprüht, den gleichen R_f-Wert von 0,80. Ein zweiter Stoff zeigte den R_f-Wert von 0,71. Nach dem chromatographischen Reinigen im gleichen System zeigten beide aus Scharfstoff 1 gebildeten Stoffe im Massenspektrum ein Molekülion der MZ 306.

Im IR-Spektrum (Abb. 18) des Stoffes, der den R_f-Wert 0,80 zeigte, fehlten die bei Scharfstoff 1-Dialdehyd vorhandenen Carbonylbanden bei 1710 und 1675 cm⁻¹, sowie die Banden bei 2730 cm⁻¹ (Abb. 14, S. 70) fast

vollständig. Neu waren hier die drei Banden bei 975, 1016 und 1095 cm^{-1} , die für die C-O-C-Valenzschwingung charakteristisch sind.

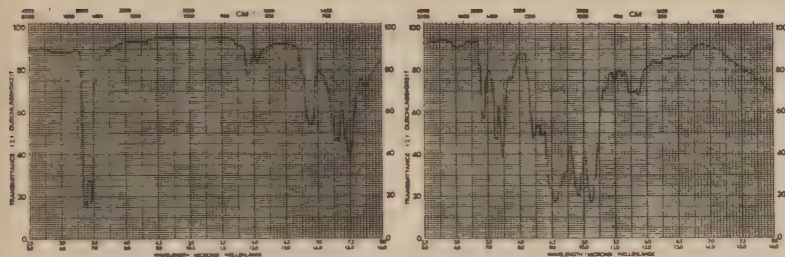


Abb. 18: Infrarotspektrum des Scharfstoff 1-bis-äthylacetals

Eine für ein Halbacetal charakteristische OH-Bande fehlt in diesem IR-Spektrum. Somit hat sich aus Scharfstoff 1 beim Stehen in absolutem Aethanol auch das Scharfstoff 1-bis-äthylacetal gebildet.

Der zweite aus Scharfstoff 1 gebildete Stoff mit dem Rf-Wert 0,71 zeigt im IR-Spektrum (Abb. 19) eine Carbo-

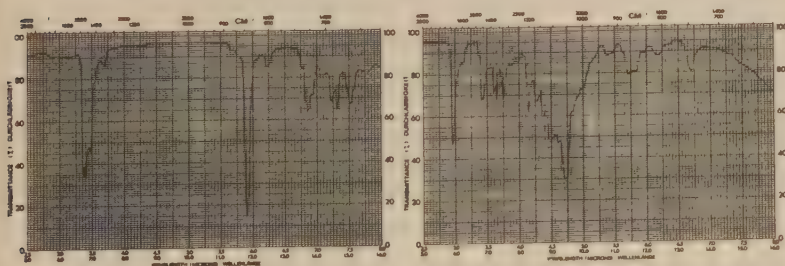
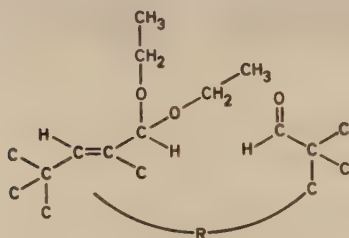


Abb. 19: Infrarotspektrum des Scharfstoff 1-mono-diäthylacetals

nylbande bei 1700 cm^{-1} , die der α,β -gesättigten Aldehydgruppe zuzuschreiben ist, die weiter eine schwache Bande bei 2700 cm^{-1} zeigt. Eine OH-Bande ist hier gleichfalls nicht vorhanden.

Somit hat die reaktionsfähigere, α,β -ungesättigte Aldehydgruppe des Scharfstoffes 1 ein Diäthylacetal gebildet und die zweite Aldehydgruppe blieb unverändert.



Das Scharfstoff 1-mono-diäthylacetal ist weniger stabil als das Scharfstoff 1-bis-äthylacetal. Aus dem Oxydationsansatz von Scharfstoff 2 erhielt ich ursprünglich bei der Chromatographie auch zwei Flecken mit den Rf-Werten 0,80 und 0,71. Die Substanz mit dem Rf-Wert 0,71 verschwand jedoch beim weiteren Chromatographieren. Offensichtlich hatte sich das Scharfstoff 2-mono-diäthylacetal auf dem Kieselgel in die Ausgangsprodukte gespalten.

Auch beim erneuten Chromatographieren des reinen Scharfstoff 2-bis-äthylacetals wurde immer wieder Scharfstoff 2 abgetrennt.

Mit Sicherheit kann angenommen werden, dass Scharfstoff 2 auch das Mono-diäthylacetal bildet.

Bei längerem Stehen einer Lösung von Scharfstoff 2 in absolutem Aethanol konnten schliesslich beide Acetalformen des Scharfstoffes 2 chromatographisch nachgewiesen werden. Die Bildung dieser Acetale wird bei beiden Scharfstoffen durch Alkalizusatz wesentlich beschleunigt.

Aus der höheren optischen Drehung der beiden Scharfstoffe in äthanolischer Lösung gegenüber der Lösung in Dioxan muss angenommen werden, dass sich zunächst orientierte Halbacetale bilden, da kein Mono-diäthylacetal und kein Bis-äthylacetal in den ersten Stunden nachgewiesen werden konnte, obwohl ich eine Erhöhung der optischen Drehung feststellte.

Es ist anzunehmen, dass sich aus dem Bis-äthylhalbacetal das Aethylhalbacetal-diäthylacetal (Vollacetal der α,β -ungesättigten Aldehydgruppe) bildet, aus dem unter Austritt eines Moleküls Aethanol das Bis-äthylacetal gebildet wird.

Aus der Bildung des cyclischen Aethers zwischen den beiden ursprünglichen Kohlenstoffatomen der Aldehydgruppen muss gefolgert werden, dass die beiden Aldehydgruppen von Scharfstoff 1 und 2 räumlich sehr nahe stehen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Nach einer Reihe von Versuchen gelang es mir, das bisher nicht näher erkannte scharf schmeckende Prinzip des Wolligen Milchlings, *Lactarius vellereus* FR., aus dem Milchsaft des Pilzes zu isolieren und mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie in zwei isomere Substanzen der Summenformel $C_{15}H_{20}O_2$ aufzutrennen.

Die beiden Sesquiterpene, die den charakteristischen scharfen Geschmack des Pilzes aufweisen und mindestens zu je 0,01% im frischen Pilz vorhanden sind, wurden als Dialdehyde erkannt und der Einfachheit halber zunächst Scharfstoff 1 und Scharfstoff 2 genannt.

Scharfstoff 1 hat einen Schmelzbereich von $87-87,5^\circ$ und ist optisch inaktiv. Scharfstoff 2 hat einen Schmelzbereich von $104,5-105^\circ$ und zeigt die spezifische Drehung $[\alpha]_D^{20} = 274,9^\circ$. In beiden Scharfstoffen sind die zwei Aldehydgruppen gleich gebunden und zwar weist die eine Aldehydgruppe eine Konjugation zu einer C-C-Doppelbindung auf. Der scharfe Geschmack der beiden Substanzen ist an die Aldehydgruppen gebunden - bei der Reduktion zum Diol verlieren sie den charakteristischen Geschmack. Weiter weisen beide Substanzen je drei Methylgruppen auf, von denen eine bei Scharfstoff 1 am α -Kohlenstoff-

atom ein Proton trägt. Alle übrigen Methylgruppen sind an quartäre Kohlenstoffatome gebunden. Die verbleibenden zehn Kohlenstoffatome verteilen sich bei Scharfstoff 1, der zwei C-C-Doppelbindungen aufweist, auf zwei Ringe.

Scharfstoff 2 hat eine C-C-Doppelbindung und drei Ringe, von denen einer einen vierfach substituierten Cyclopropanring darstellt.

Zwischen den Kohlenstoffatomen der ursprünglichen Aldehydgruppen vermögen beide Scharfstoffe aus dem Bis-äthylhalbacetal beziehungsweise Äthylhalbacetal-di-äthylacetal unter Austritt von Wasser beziehungsweise Äthanol eine weitere Ätherbindung zu bilden.

Aus dem Entstehen des cyclischen Äthers muss gefolgert werden, dass bei beiden Substanzen die Aldehydgruppen räumlich nahe stehen und sterisch günstig angeordnet sind.

Durch Umsetzung der beiden Substanzen und anschließende spektroskopische Untersuchungen wurden noch weitere Strukturelemente festgestellt.

Auf Grund der physikalischen und chemischen Eigenschaften der beiden Sesquiterpene liegen zwei bisher nicht bekannte Substanzen vor. Analog der in dieser Arbeit gebrauchten Bezeichnung Scharfstoff 1 und Scharfstoff 2 schlage ich vor, die beiden Substanzen *V e l l e r a l* und *i s o - V e l l e r a l* zu benennen.

P R A K T I S C H E R T E I L

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Heiztischmikroskop der Fa. Leitz unter Verwendung von Anschützthermometern bestimmt. Die Molekulargewichtsbestimmungen wurden mit dem Mechrolab Dampfdruckosmometer 301 A (Benzol) bzw. massenspektrometrisch durchgeführt. Die optische Drehung wurde mit dem Zeiss-Kreispolarimeter $0,01^\circ$ unter Verwendung von 50 bzw. 100 mm, Durchmesser 3,5 mm, Polarimeterrohren bestimmt.

Die CH- und N-Bestimmungen wurden im Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der hiesigen Universität und von der Fa. Ilse Beetz, Kronach, ausgeführt. Die UV-Spektren wurden mit dem registrierenden Zeiss-Spektralphotometer R P Q 20 A unter Verwendung von 0,1 cm Küvetten, entsprechend 0,2 cm Schichtdicke, gemessen. Als Lösungsmittel diente n-Hexan.

Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer Gittergerät 237 aufgenommen. Von den festen Substanzen wurden KBr-Presslinge hergestellt, die flüssigen Substanzen wurden zwischen NaCl-Prismen zu einem Film verteilt.

Die abgebildeten KMR-Spektren wurden mit dem Gerät A 60 und ein nicht abgebildetes Spektrum mit dem Gerät A 60 A der Firma Varian aufgenommen. Als Lösungsmittel diente Deuteriochloroform. Mehrfach musste ich feststellen, dass sich die im KMR-Spektrometer gemessenen Lösungen beider Scharfstoffe beim anschliessenden Einengen im Rotationsverdampfer braun-schwarz verfärbten, wobei erhebliche Mengen der Scharfstoffe verloren gingen. Diese Zersetzung wurde ausgeschlossen,

indem ich die Lösung nach der Aufnahme der KMR-Spektren für kurze Zeit in flüssigem Stickstoff unterkühlte und anschliessend erst die Substanzen wiedergewann.

Zu den Gaschromatographischen Untersuchungen diente das Gerät Autoprep A 700 der Fa. Wilkins.

Die abgebildeten Massenspektren wurden mit dem Atlas CH4 - Massenspektrometer mit der Ofenschleuse TO4 ausgerüstet, bei Registrierung mit einem Lichtpunktschreiber, hergestellt. Weitere Massenspektren wurden mit dem Atlas CH4 - Massenspektrometer, H.T.E. 140°, Tintenschreiber, angefertigt.

Vergleichende Extraktion des Pressaftes mit verschiedenen Lösungsmitteln

Zwei grössere Pilze wurden halbiert (1. à 86,0 g, 2. à 83,5 g) und in zwei Teilen ausgepresst. Beim Pressvorgang wurde das Pressgut nach dem ersten Auspressen "gewendet".

Auf diese Weise konnte fast die doppelte Menge des Pressaftes gegenüber einem einmaligem Auspressen erhalten werden. Der Pressaft wurde einerseits in 100 ml eisgekühltem Aether und andererseits in 100 ml genauso gekühltem Benzol aufgefangen. Nach dem Ausschütteln und trocknen mit Natriumsulfat wurden gleiche Mengen dieser Lösungen auf Kieselgel G Platten aufgetragen, mit Cyclohexan-Chloroform-Essigsäureäthylester (60+20+20) entwickelt und mit Antimonpentachlorid in Chloroform besprüht. In einem genauso geführten, weiteren Versuch wurde die Extraktion von Aether und Methylenchlorid verglichen.

Herstellung des Benzolextraktes aus dem Milchsaff

In zwei Arbeitsgängen wurden 5540 g und 5240 g frisch gesammelter Pilze mit Hilfe einer 2,5 l fassenden, aus einer Aluminiumlegierung bestehenden, Tinkturenpresse¹ in kleinen Anteilen ausgepresst und der Pressaft trotz starker Emulsionsbildung 5 mal mit Benzol ausgeschüttelt. Die Emulsionen wurden mit Hilfe einer Zentrifuge in 2 x 350 ml V2A-Bechern gebrochen. Die abgehobenen, gesammelten und mit Natriumsulfat getrockneten Benzolausschüttelungen wurden mit einem Rotationsverdampfer im Vakuum eingeengt.

Abtrennung der Fettsäuren aus dem Benzolextrakt

Vorversuch

5 g des eingeengten Benzolextraktes wurden mit 50 ml

Benzol verdünnt und mit 120 ml einer mit Natriumchlorid gesättigten 5%igen Natriumcarbonatlösung versetzt und geschüttelt. Hierbei fiel eine fettige weisse Masse aus, die sich beim Zentrifugieren zwischen der Benzol- und Wasserschicht ansammelte. Die Benzollösung wurde abgehebert, die weisse fettige Masse herausgenommen und der Rest der Benzolphase von der wässrigen Phase im Scheidetrichter befreit. Die wässrige Phase enthielt keine organischen Substanzen. Hierauf wurde die weisse fettige Masse, die im wesentlichen die freien Fettsäuren darstellte, in einen Scheidetrichter eingebracht und 1 n Salzsäure und Benzol, der mit einem kleinen Anteil Aether versetzt war, hinzugefügt. Durch kräftiges Schütteln lösten sich die Fettsäuren wieder. Sie wurden erneut nach dem Abtrennen der Salzsäure, Einengen und Auflösen in Benzol mit der mit Natriumchlorid gesättigten 5%igen Natriumcarbonatlösung ausgefällt. Nach diesem zweiten Ausfällen haftete diesem Gemisch nur noch eine geringe Menge der Scharfstoffe an. Die beiden Benzolphasen wurden vereinigt.

In gleicher Weise, wie im Vorversuch, wurden aus dem übrigen Benzolextrakt die Fettsäuren abgetrennt. Insgesamt wurden so 30,8 g des von den Fettsäuren weitgehend befreiten Benzolextraktes erhalten, der sehr scharf schmeckte.

Bereitung der Säulen zur Chromatographie des Benzolextraktes

In eine 150 cm lange Säule mit einem Durchmesser von 3,6 cm wurden mit dem gleichen Laufmittel wie bei der Dünnschichtchromatographie je 650 g Kieselgel der Korngrösse 0,05-0,2 mm unter Abtropfen eingeschlemmt, sodass eine 125-127 cm hohe, fast transparente Kieselgelschicht entstand. Nachdem die Säule mit ca. 750 ml des Laufmittels gewaschen wurde, wurde sie mehrere Stunden (über Nacht) zum vollständigen Setzen stehengelassen.

Chromatographie des vorgereinigten Benzolextraktes

In drei Arbeitsgängen wurden die 30,8 g des von den Fettsäuren weitgehend befreiten Benzolextraktes aufgearbeitet und zwar:

1. Säulenfüllung ca. 15 g Extrakt,
2. Säulenfüllung ca. 6 g Extrakt,
3. Säulenfüllung ca. 10 g Extrakt.

Nach sehr sorgfältigem Auftragen dieser Extraktmengen wurde mit dem gleichen Laufmittel chromatographiert. Nachdem ein Vorlauf, der etwa dem in der Säule vorhandenen Volumen des Laufmittels entsprach, durchgelaufen war, wurden die Fraktionen mit einem Radi-Rack-Fraktionensammler zu je 15 ml gesammelt.

In dieser Weise wurden aufgefangen:

- won der 1. Säulenfüllung 192 Fraktionen,
- won der 2. Säulenfüllung 211 Fraktionen und
- won der 3. Säulenfüllung 192 Fraktionen.

Die Kontrolle der Vereinigung der Fraktionen wurde mittels Dünnschichtchromatogrammen, die mit dem gleichen Laufmittel entwickelt wurden, geführt.

	Scharfstoff 2	Scharfstoff 1+2	Scharfstoff 1
1. Säulenfüllung Fraktion Nr.	50-60	61-78	79-97
2. Säulenfüllung Fraktion Nr.	32-42	43-136	137-149
3. Säulenfüllung Fraktion Nr.	37-49	50-65	66-83

Das Gemisch der Scharfstoffe 1+2 wurde auf einer 4. Säule unter gleichen Bedingungen nochmals chromatographiert und insgesamt folgende Mengen erhalten:

Scharfstoff 1	0,357 g,
Scharfstoff 1+2	0,875 g,
Scharfstoff 2	1,717 g.

Der Scharfstoff 1 liess sich vorerst nicht kristallisieren. Das Gemisch erstarrte nach dem Abdunsten des Lösungsmittels. Der Scharfstoff 2 wurde aus Essigsäureäthylester fraktioniert kristallisiert und 1,058 g farblose, rhombische Kristalle erhalten.

Herstellung der Platten für die präparative Schichtchromatographie

Mit einer wässrigen Suspension wurden 20 x 40 cm Platten mit je 50 g Kieselgel PF₂₅₄ der Fa. Merck durch Ausgiessen beschichtet. Nach dem Trocknen an der Luft während 36 Stunden in einem möglichst zugluft-freiem Raum, wurden die Platten bei 110° eine Stunde lang aktiviert.

Trennung und Isolierung der Scharfstoffe mittels der präparativen Schichtchromatographie

Der auf gleichem Wege, wie bei den oben geschilderten Versuchen, hergestellte Benzolextrakt des Pressaftes wurde im Gegensatz zur Säulenchromatographie ohne Abtrennen der Fettsäuren nach weitgehendem Abdunsten des Benzols und Aufnehmen im Laufmittel auf die Platten aufgetragen. Die Platten (20 x 40 cm) wurden sodann mit 50 ml Laufmittel besprüht, zwischendurch aufeinandergelegt um ein Abdunsten des Laufmittels zu vermeiden, und in die gesättigte Kammer eingebracht. Die Trennung wurde unter UV-Licht kontrolliert und die Platten 3-5mal bis zur vollständigen Trennung der Zone der Scharfstoffe chromatographiert. Das Laufmittel wurde zwischendurch und nach erfolgter Trennung nicht vollständig abgedunstet. Zum Anzeichnen der Banden unter der UV-Lampe und bis zum Herauskratzen der Banden wurden die noch feuchten, jedoch nicht mehr transparenten Platten aufeinandergelegt.

Das herausgekratzte Kieselgel der jeweiligen Zone wurde im Mörser verrieben und in einem Kolben durch fünfmaliges Ausschütteln mit Essigsäureäthylester und Absaugen auf einem Büchnertrichter eluiert, sodass das Kieselgel nach dem Abdunsten des Lösungsmittels nicht mehr scharf schmeckte. Die eingeeengte Lösung wurde nochmal über eine G3-Fritte filtriert (feinstes Kieselgel) und die Scharfstoffe fraktioniert auskristallisiert.

Dichtebestimmung

V e r d r ä n g u n g s m e t h o d e

Die Schwierigkeit dieser Bestimmung war, dass als Flüssigkeit, in der sich der Scharfstoff 2 überhaupt nicht löst, nur Wasser zur Verfügung stand; in diesem jedoch die eingebrachten Kriställchen nicht benetzt wurden und durch anhaftende Luftblasen Auftrieb erlitten. Ich begegnete dem, indem ich die Kriställchen in Aluminiumfolie einwickelte, das Ganze mit einem V2A-Draht am Boden festhielt und mehrfach evakuierte. Die Aluminiumfolie und der V2A-Draht wurden im Leerwert des 1 ml Pyknometers berücksichtigt.

S c h w e b e m e t h o d e

Durch Mischen von reinem Wasser und 5%iger wässriger Kaliumjodidlösung wurden die Kriställchen nach dem Entfernen der anhaftenden Luft zur Schwebelösung gebracht und von dieser so eingestellten Lösung mit einem 5 ml Pyknometer die Dichte bestimmt.

Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon des Scharfstoffes 2

20,1 mg des Scharfstoffes 2 wurden in 0,3 ml Aethanol (absolut, aldehydfrei) mit 1 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Reagens (5,0 g 2,4-DNPH + 60 ml 85%ige Phosphor-

säure + 39,5 ml 95%igem Aethanol) versetzt, wobei sofort ein Niederschlag ausfiel, der abfiltriert, mit wenigen Tropfen Aethanol (absolut aldehydfrei) gewaschen und anschliessend aus dem gleichen Lösungsmittel auskristallisiert wurde. Die gewonnenen Kristalle wurden aus Benzol, das mit wenigen Tropfen Ligroin versetzt wurde, umkristallisiert. Die Reinheitsprüfung erfolgte auf Kieselgel G-Platten mit dem System Benzol-Essigester (95+5). Das Bis-2,4-dinitrophenylhydrazon des Scharfstoffes 2 zeigte einen Rf-Wert von 0,52 bei einer Laufstrecke von 15 cm.

Reduktion des Scharfstoffes 2 mit Natriumborhydrid

150 mg Scharfstoff 2 wurden in 2,5 ml Dioxan-Wassergemisch (80 + 20) gelöst und zur Lösung von 50 mg Natriumborhydrid in 7 ml des gleichen Lösungsmittels unter Eiskühlung und kräftigem Rühren während 1/2 Stunde zugetropft. Die Mischung wurde eine Stunde lang weiter gerührt und sodann bei Zimmertemperatur weitere 4 Stunden stengelassen. Hierauf wurde der Natriumborhydridüberschuss zerstört. Unter Rühren wurde mit 2 n Schwefelsäure bis pH 4 tropfenweise versetzt. Durch Wasserzusatz wurde die ausgefallene Borsäure gelöst.

Beim Abdestillieren des Dioxans fiel ein starker flockiger Niederschlag aus. Diese Suspension wurde 5mal mit 15 ml Chloroform ausgeschüttelt, mit Natriumsulfat getrocknet, eingeengt und aus Benzol kristallisiert.

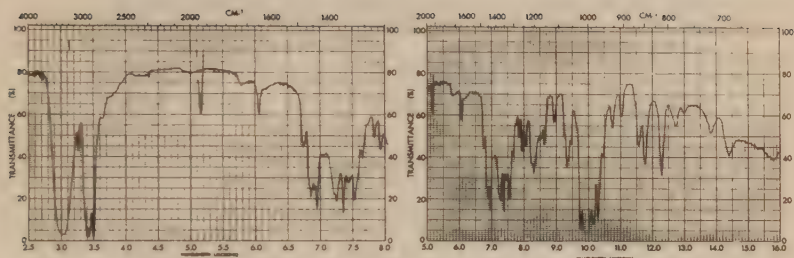


Abb. 20: Infrarotspektrum des Scharfstoff 2-Dialkohols

Versuchte Oxydation von Scharfstoff 2

Zu einer Lösung von 200 mg Scharfstoff 2 in 10 ml Aethanol wurde eine Lösung von 320 mg Silbernitrat in 4 ml Wasser hinzugefügt und anschliessend unter Rühren eine Auflösung von 113 mg Natriumhydroxid in Aethanol tropfenweise zugegeben. Die Mischung wurde unter Lichtausschluss 2 Stunden bei Zimmertemperatur unter Stickstoffbegasung gerührt.

Nach dem Entfernen des Silberoxids wurde mit Wasser verdünnt und mit Aether ausgeschüttelt. Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurden 168 mg einer öli- gen Flüssigkeit erhalten, die gereinigt (1 PC-Platte 20 x 40 cm, 50 g Kieselgel PF_{254} , Cyclohexan-Essigester 80 + 20, Rf-Wert 0,65) 113 mg einer fast farblosen öli- gen Flüssigkeit ergaben. Nach dem Ansäuern der obi- gen Lösung mit Schwefelsäure konnte mit Aether nur ei- ne geringe Menge eines harzigen Gemisches isoliert werden.

Die im theoretischen Teil angegebenen Untersuchungen von Scharfstoff 1 erfolgten analog denen von Scharf- stoff 2.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. J.V. KROMBHOLZ, Naturgetreue Abbildungen und Beschreibungen der essbaren, schädlichen und verdächtigen Schwämme. J.G. Calve Verlag, Prag 1831-1846, Heft 8, S. 8-9.
2. JAKOB E. LANGE, Flora Agaricina Danica, Copenhagen 1935-1940.
3. HERMANN JAHN, Pilze rundum. Park-Verlag, Hamburg 1949.
4. LINUS ZEITLMAYR, Knaurs Pilzbuch. Th. Knaur Nachf. Verlag, München 1955.
5. MICHAEL - HENNING, Handbuch für Pilzfreunde. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.
6. JAKOB E. LANGE und MORTEN LANGE, 600 Pilze in Farben. BLV Verlagsgesellschaft, München 1962.
7. TROMMSDORFF, Ann. Chimie, 22 (1797) 218-220.
8. H. BRACONNOT, Ann. Chimie, 79 (1811) 265-304; 80 (1811) 272-292; 87 (1813) 237-270.
9. W. KNOP und SCHNEDERMANN,
 - a) J. prakt. Chem., 32 (1844) 411-416;
 - b) ref. Liebigs Ann. Chem., 49 (1844) 243.
10. P. BOLLEY, Liebigs Ann. Chem., 86 (1853) 44-51.
11. M. DESSAIGNES, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci., 37 (1853) 282-284.
12. W. MARMÉ, Liebigs Ann. Chem., 129 (1864) 222-225.
13. EMILE BOUDIER, Die Pilze. Berlin 1867, S. 77-80, 95-96.
14. EL. BORŠČOV, Bulletin de l'Académie Impériale des Sciences de St. Pétersbourg, 14 (1870) 1-23.
15. NICOLAS SOCOLOFF, Analyses de quelques especes de champignons comestibles, exécutées dans le laboratoire de l'institut agronomique de St. Pétersbourg, 1873.
16. W. WOLF und O.E.R. ZIMMERMANN, Botanische Zeitung, 29 (1871) 280-292 und 295-300.
17. TH. BISSINGER, Über Bestandteile der Pilze Lactarius piperatus, Elaphomyces granulatus. Dissertation Erlangen 1883
und gleicher Wortlaut
TH. BISSINGER, Arch. Pharmaz., Ber. deutsch. pharmaz. Ges., 221 (1883) 321-344.

18. K.V. MARGEVIČ, Sjedobnye griby, opredelenie v nich količestva pitatelnych veščestv. Dissertation St. Petersburg 1883.
19. WILH. THOERNER, Ber. dtsh. chem. Ges., 12 (1879) 1635-1637.
20. R. CHODAT und PH. CHUIT, Arch. Sci. physiques natur. Genève, 21 (1889) 385-403.
21. PH. CHUIT,
 - a) Bull. Soc. chim. France, 2 (1889) 153-159;
 - b) Ber. dtsh. chem. Ges., 22 (1889) 763-764.
22. E. BOURQUELOT,
 - a) C. R. hebd. Séances Acad. Sci., 108 (1889) 568-570;
 - b) J. Pharmac. Chim., [5.] 19 (1889) 369-374;
 - c) Bull. Soc. Mycol. Fr., 5 (1889) 132-163.
23. A. MUENTZ, C. R. hebd. Séances Acad. Sci., 76 (1873) 649-650; 79 (1874) 1182-1184.
24. E. BOURQUELOT, Bull. Soc. Mycol. Fr., 7 (1891) 5-7.
25. E. GERARD,
 - a) J. Pharmac. Chim., [5.] 21 (1890) 408-414; [5.] 23 (1891) 7-12;
 - b) Bull. Soc. Mycol. Fr., 6 (1890) 115-134.
26. C. TANRET, J. Pharmac. Chim., [5.] 19 (1889) 225-227.
27. E. GERARD, Bull. Soc. Mycol. Fr., 8 (1892) 169-175.
28. KOBERT, Sitzungsberichte der Naturforscher-Gesellschaft Dorpat, 9 (1889-1891) [Heft 3] 535-554.
29. E. BOURQUELOT, Bull. Soc. Mycol. Fr., 10 (1894) 133-142.
30. E. BOURQUELOT und G. BERTRAND, Bull. Soc. Mycol. Fr., 12 (1896) 18-32.
31. E. BOURQUELOT, J. Pharmac. Chim., [6.] 4 (1896) 145-150 und 241-248.
32. R. CHODAT und A. BACH, Ber. dtsh. chem. Ges., 35 (1902) 3943-3946.
33. A. ZEGA, Chemiker-Ztg., 26 (1902) 10.
34. J. BOUGAULT und C. CHARAUX,
 - a) J. Pharmac. Chim., [7.] 4 (1911) 337-343;
 - b) C. R. hebd. Séances Acad. Sci., 153 (1911) 572-573.
35. J. BOUGAULT und C. CHARAUX,
 - a) J. Pharmac. Chim., [7.] 4 (1911) 489-492;
 - b) C. R. hebd. Séances Acad. Sci., 153 (1911) 880-881.

36. J. BOUGAULT und C. CHARAUX, J. Pharmac. Chim., [7.] 5 (1912) 65-71.
37. JULIUS ZELLNER, Mh. Chem., 34 (1913) 321- 336.
38. M. BARLOT, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci., 172 (1921) 87-89.
39. GERTRUDE MAUD ROBINSON und ROBERT ROBINSON, J. chem. Soc. [London], 127 (1925) 175-180.
40. HEINRICH WIELAND und HERMANN SUTTER, Ber. deutsch. chem. Ges., 61 (1928) 1060-1068.
41. D. AYE, Dtsch. Apotheker-Ztg., 47 (1932) 1027-1028.
42. HAROLD R. DALTON und J. M. NELSON, J. Amer. chem. Soc., 60 (1938) 3085; 61 (1939) 2946-2950.
43. T.A. KEZELI und L.I. DZAPARIDZE, Soobščeniia Akademii Nauk Gruzinskoj SSR, Tbilisi, 5 (1944) [Nr. 8-10] 993-996.
44. N.I. ORLOV, Sjedobnye i jadovitye griby, gribnye otrawlenija i ich profilaktika. Medgiz, Moskva 1953.
45. W.D. STEWART, W.L. WACHTEL, J.J. SHIPMAN und J.A. YANKO, Science [New York], 122 (1955) 1271-1272.
46. TAKAYOSHI HIGUCHI, ICHIIJI KAWAMURA und IKUJI HAYASHI, J. Japan Wood Research Soc. (Nippon Mokuzai Gakkaishi), 2 (1956) 31-35; ref. C. A., 50 (1956) 7211.
47. GILBERTE LEGRAND, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales, 151 (1957) 921-925 und Bull. Soc. Chim. biol., 39 (1957) 1289-1297.
48. GILBERTE LEGRAND und GEORGES MARTIN, Qualitas Plantarum Mater. vegetabiles, 3-4 (1958) 521-528.
49. ELARD STEIN von KAMIENSKI, Planta, 50 (1957-1958) 331- 352.
50. J. HERINK, Otravy houbami; Výňatek z knihy V. VONDRÁČKA a O. RIEDLA, Klinická toxikologie, Praha 1958.
51. J.L. BONNET, Bull. trim. Soc. Mycol. Fr., 75 (1959) 215-352.
52. RALPH F. ANDERSON, THOMAS I. BAKER, LAWRENCE G. JAYKO, ROBERT G. BENEDICT, Biochim. biophysica Acta, 50 (1961) 374-375.
53. KAZUO KURIHARA, YOSHIHIRO KATO, YUKIE TAKEI und SABURO SHICHIJI, Kōgyō gijutsuin, Hakkō Kenkyūsho, Kenkyū hōkoku, 22 (1962) 61-68; 24 (1963) 25-33; ref. C. A., 60 (1964) 14854- 14855.

54. KAZUO KURIHARA, KATSUHIRO KATO, SABURO NANAJI,
Japan, Patent Nr. 23,646('63)
Hatsumei - Kyokai (Invention Association),
c/o Patent Office, No. 1 San-nen-cho, Chiyodaku,
Tokyo. ref. C. A., 60 (1964) 3177 h.
55. JOZEF SZYMCAK, Roczniki Państwowego Zakładu
Higieny, 8 (1962) 467-471.
56. HOUBEN - WEYL, Methoden der organischen Chemie,
Bd. 8, Sauerstoffverbindungen 3, S. 407-413.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1952.
57. P. DE MAYO, E.Y. SPENCER, R.W. WHITE,
Canad. J. Chem., 39 (1961) 1608-1612.
58. HOUBEN - WEYL, Methoden der organischen Chemie,
Bd.2, Analytische Methoden, S. 448-449.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953.
59. A. HUNGER, T. REICHSTEIN, Chem. Ber.,
85 (1952) 635.
60. E. SCHENKER, Angew. Chem., 73 (1961) 81-107.
61. I.C. NIGAM, J. Chromatogr., 24 (1966) 188-192.
62. ORGANIKUM, 3. Aufl., VEB Deutscher Verlag der
Wissenschaften, Berlin 1964.
63. L.J. BELLAMY, Ultrarotspektrum und chemische
Konstitution, 2. Aufl., Dr. Dietrich Steinkopff-
Verlag, Darmstadt 1966.
64. C.N.R. RAO, Chemical Application of Infrared
Spektroskopie. Academic Press, New York 1963.
65. GERHARD SPITELLER, Massenspektrometrische Struk-
turanalyse organischer Verbindungen.
Verlag Chemie, Weinheim 1966.

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Pharmazeutische Technologie der Philipps-Universität Marburg auf Anregung und unter Leitung von Herrn Professor Dr. P.H. List angefertigt.

Herrn Professor Dr. P.H. List möchte ich an dieser Stelle für die Zuweisung dieses Themas und für das grosse Interesse, das er der Arbeit stets entgegenbrachte, sowie für die bei der Ausführung erwiesene Unterstützung, aufrichtig danken.

Herrn Professor Dr. H. Böhme bin ich zu grossem Dank verpflichtet für die grosszügige Gewährung bei der Benutzung der Einrichtungen und Geräte des von ihm geleiteten Institutes für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie der Universität Marburg.

Herrn Dr. Wilhelm Meise, Farbenfabriken Bayer AG, Leverkusen, sowie Herrn Dr. Uwe Zahorszky, Institut für Organische Chemie der Universität Marburg, danke ich für die grosszügige Aufnahme der Massenspektren.

Lebenslauf

Als Sohn des praktischen Arztes Dr. Josef Hackenberg und seiner Ehefrau Erna, geborene Hart, wurde ich am 18. Juli 1940 in Unter Sandau bei Marienbad geboren.

Meine gesamte Schulbildung absolvierte ich mit tschechischer Unterrichtssprache und zwar 5 Jahre an der Volksschule: 1946-48 in Unter Sandau, 1948-50 in Einsiedel, 1950-51 in Unter Sandau; 3 Jahre an der Mittelschule: 1951-54 in Bad Königswart; 3 Jahre an der Elfjährigen Mittelschule: 1954-57 in Eger. An der letztgenannten Schule legte ich am 5. Juni 1957 das Abitur ab.

In die BRD siedelten wir am 21. Dezember 1957 aus der Tschechoslowakischen Republik um. Hier legte ich am 18. April 1958 in München die Ergänzungsprüfung für Inhaber ausländischer Vorbildungsnachweise ab. Anschließend trat ich meine Praktikantenzeit in der Schelde-Apotheke in Niederscheld (Dillkreis) an, die bis zum März 1960 dauerte. Während dieser Zeit legte ich in Wiesbaden eine Prüfung in der lateinischen Sprache (Kleines Latinum) und gleichfalls in Wiesbaden im Februar 1960 die pharmazeutische Vorprüfung ab.

Das Pharmaziestudium begann ich im SS 1960 an der Universität Münster; im WS 1961/62 studierte ich an der Universität Innsbruck. Von da kam ich zum SS 1962 wieder nach Münster und legte nach dem WS 1962/63, dem 6. Semester, das pharmazeutische Staatsexamen ab.

Während dem SS 1963 kam ich an die Philipps-Universität nach Marburg, wo ich mein Studium fortsetzte und unter Leitung von Herrn Professor Dr. P.H. List mit der Ausführung der vorliegenden Dissertation begann. In dieser Zeit war ich zwei Jahre mit der Verwaltung einer wissenschaftlichen Assistentenstelle in pharmazeutischer Technologie beauftragt.

Die Bestallung als Apotheker wurde mir im Juli 1964 erteilt.



